

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 4 月 25 日 (25.04.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/33094 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/53,
5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C12P 21/02, 21/08, C07K 16/24,
A61K 39/395, A61P 9/10, G01N 33/53

[JP/JP]: 〒194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/09218

(74) 代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2001 年 10 月 19 日 (19.10.2001)

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2000-319985
2000 年 10 月 19 日 (19.10.2000) JP

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP). 株式会社 ヘリックス研究所 (HELIX RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532-3 Chiba (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 設楽研也 (SHI-TARA, Kenya) [JP/JP]. 古谷安希子 (FURUYA, Akiko)

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTIBODY INHIBITING VPLF ACTIVITY

(54) 発明の名称: VPLFの活性を阻害する抗体

(57) Abstract: An antibody which specifically recognizes a protein containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 and inhibits the activity of this protein as a growth factor. Namely, a monoclonal antibody specifically reacting with human VPLF and inhibiting its activity is constructed. This antibody is usable as a remedy or a diagnostic for diseases in which VPLF participates, i.e., diseases associated with abnormal acceleration of angiogenesis, eye diseases based on abnormal angiogenesis, arthritis based on abnormal angiogenesis, skin diseases associated with abnormal angiogenesis, diseases associated with abnormal acceleration of vasopermeability, diseases associated with abnormal differentiation/proliferation of smooth muscular cells, diseases associated with abnormal differentiation/proliferation of kidney mesangial cells, diseases associated with abnormal differentiation/proliferation of blood stem cells, diseases based on abnormality in osteoblasts, diseases based on abnormality in pancreatic β cells, ischemic diseases and diseases associated with retarded wound healing.

[続葉有]



WO 02/33094 A1



(57) 要約:

配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質を特異的に認識し、かつ該蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する抗体を提供する。本発明によれば、ヒト V P L F に特異的に反応し、かつその活性を阻害するモノクローナル抗体を作製し、V P L F の関与する疾患、すなわち、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓 β 細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患の治療薬又は診断薬として利用することができる。

明 細 書

V P L F の活性を阻害する抗体

技術分野

本発明は、新規な抗体、並びに該抗体を用いた診断薬、医薬及び治療薬に関する。

背景技術

血管形成、血管新生活性を有する血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor、以下「V E G F」という) 及び平滑筋細胞の分化、増殖活性を有する血小板由来増殖因子 (Platelet-derived growth factor、以下「P D G F」という) は構造が類似しており、類縁因子である P 1 G F, V E G F - B, V E G F - C, V E G F - D, V E G F - E を含めて V E G F / P D G F スーパーファミリーの増殖因子と分類されている。

血管新生は、脊椎動物の胎生期における循環器系の形成や多くの組織の構築に重要な役割を果たすとともに、成熟個体 (雌) においても性周期における黄体形成、子宮内膜の一過性の増殖、胎盤形成などに密接に関与する。さらに、病的状態としては、固形腫瘍の増殖、転移形成、糖尿病性網膜症、慢性関節リュウマチの病態形成、促進に血管新生が深く関与している (J. Folkmanら ; J. Biol. Chem., 267, 10931, 1992)。

血管新生は、血管新生因子が分泌される過程、これが引き金となって近傍にある既存の血管の内皮細胞からプロテアーゼが分泌される過程、該プロテアーゼにより基底膜及び間質が破壊される過程、続いて血管内皮細胞の遊走及び増殖がはじまる過程、並びに、管腔が形成されることにより血管が新生される過程よりなる (J. Folkmanら ; J. Biol. Chem., 267, 10931, 1992)。血管新生を誘導する因子としては多くの因子の関与が報告されているが、中でも血管透過性因子 (Vascular permeability factor、以下「V P F」という) / V E G F が上記発生段階における血管新生及び病的な状態における血管新生において最も重要な因子として知られている (M. Shibuya; Advances in Cancer Research, 67, 281, 1995)。

V P F / V E G F はホモダイマーよりなる分子量約4万の蛋白質であり、1983年にV P F として (D. R. Sengerら ; Science, 219, 983, 1983)、1989年にV E G F として独立した分子として報告されたが (N. Ferraraら ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 161, 851, 1989)、c D N A クローニングの結果、両者は同一の物質であることが明らかとなった (D. W. Leungら ; Science, 246, 1306, 1989; P. J. K eckら ; Science, 246, 1309, 1989) (以下、「V E G F」と記載する)。V E G F の活性としてはこれまでに、血管内皮細胞に対しては増殖促進活性 (ED50 = 2-3p M) (N. Ferraraら ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 161, 851, 1989)、遊走促進活性 (A. E. Kochら ; J. Immunol., 152, 4149, 1994)、メタロプロテアーゼ分泌促進活性 (E. N. Unemoriら ; J. Cell Physiol., 153, 557, 1992)、ウロキナーゼ、tPA分泌促進活性 (M. S. Pepperら ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 181, 902, 1991)、転写因子ETS-1の発現促進 (C. Iwasakaら ; J. Cell. Physiol., 169, 522, 1996)、インテグリン $\alpha v \beta 3$ の発現上昇 (D. R. Sengerら ; Am. J. Pathol., 149, 293, 1996) 等が報告され、in vivoにおいては血管新生促進活性 (T. Asah araら ; Circulation, 92 suppl II, 365, 1995)、血管透過性促進活性 (D. R. Sengerら ; Science 219, 983, 1983) 等が報告されている。V E G F は血管内皮細胞に極めて特異性の高い増殖因子であることが報告されている (N. Ferraraら ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 161, 851, 1989)。

ヒトV E G F には、選択的スプライシングにより長さの異なる4種類の蛋白質 (それぞれ121、165、189、206アミノ酸残基よりなるV E G F₁₂₁、V E G F₁₆₅、V E G F₁₈₉、V E G F₂₀₆) が存在することが報告されている (K. A. Houckら ; J. Biol. Chem., 267, 26031, 1991)。最も短い長さのV E G F₁₂₁についても血管新生促進活性、血管透過性亢進活性が報告されている (S. Kond oら ; Biochimica et Biophysica Acta, 1243, 195-202, 1995)。V E G F₁₆₅をプラスミンで分解して得られるN末アミノ酸1番目から110番目よりなるV E G F 部分フラグメントはV E G F₁₆₅と同等の受容体結合活性を有するが、血管内皮細胞の増殖促進活性が1/100に低下することが報告されている (B. A. Keytら ; J. Biol. Chem., 271, 7788-7795, 1996)。これらの結果は、受容体結合活性には、1番目から110番目のアミノ酸が関与するが、内皮細胞の十分な活性化にはさらに1

11番目から165番目のアミノ酸が必要であることを示している。

V E G F には、ダイマー間のジスルフィド結合形成、蛋白質分子内のジスルフィド結合形成、及び、活性発現に重要な8個のシステイン残基の存在が報告されている (J. Biol. Chem., 269, 32879-32885, 1994)。これら8個のシステイン残基は、V E G F / P D G F スーパーファミリーに属する因子間で保存されている (C. Betsholdsら ; Nature, 320, 695-699, 1986)。V E G F のアミノ酸残基の改変により V E G F 結合阻害剤を作製することが試みられ、V E G F のループIIの変異体とループIIIの変異体のヘテロダイマーはV E G F 結合阻害、血管内皮細胞増殖促進阻害活性を示すことが報告されている (G. Siemeisterら ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 4625-4629, 1998)。

ヒトのV E G F 受容体としてはこれまでに受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する第1の受容体であるFlt-1 (fms-like tyrosine kinase) (M. Shibuyaら ; Oncogene, 5, 519, 1990; C. Vriesら ; Science, 255, 989, 1992) 及び第2の受容体であるKDR (kinase insert domain-containing receptor) (B. I. Termanら ; W092/14748, B. I. Termanら ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 187, 1579, 1992) の2種が報告されている。ヒト型V E G F 受容体KDRのマウス型ホモログはFlk-1 (W. Matthewsら ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9026, 1991; A. Ullrichら ; W094/11499; B. Millauerら ; Cell, 72, 835, 1993) と命名されている。Flt-1遺伝子はもともと癌遺伝子 f m s と相同性を示す機能未知な新規遺伝子として発見されたが (M. Shibuyaら ; Oncogene, 5, 519, 1990)、V E G F 蛋白質を用いた発現クローニングによりV E G F 受容体遺伝子のクローン化が試みられた結果取得された遺伝子と一致し、Flt-1はV E G F 受容体であることが示された (C. Vriesら ; Science, 255, 989, 1992)。

Flt-1及びKDR/Flk-1の細胞外ドメインは7個のイムノグロブリン様ドメインよりなり、細胞内ドメインはチロシンキナーゼドメインを有する分子量180~200キロダルトンの膜蛋白質である。V E G F は、Flt-1及びKDR/Flk-1にそれぞれ20 p m o l / l 及び75 p m o l / l の K_d 値で特異的に結合する。また、Flt-1及びKDR/Flk-1は血管内皮細胞に特異的に発現していると報告されている (T. P. Quinnら ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7533, 1993; R. L. Kendallら ; Proc. Nat

l. Acad. Sci. USA, 90, 8915, 1993)。

血管新生を伴う疾患の中で、固形腫瘍の増殖、転移形成、糖尿病性網膜症及び慢性関節リュウマチの病態形成に V E G F が深く関与していることが報告されている。固形腫瘍については、これまでに、腎癌 (A. Takahashi ら ; Cancer Research, 54, 4233, 1994)、乳癌 (L. F. Brown ら ; Human Pathology, 26, 86, 1995)、脳腫瘍 (R. A. Berkman ら ; J. Clin. Invest., 91, 153, 1993)、消化器癌 (L. F. Brown ら ; Cancer Research, 53, 4727, 1993)、卵巣癌 (T. A. Olson ら ; Cancer Research, 54, 276, 1994) などの多くのヒト腫瘍組織において V E G F が産生されていることが報告されている。乳癌について V E G F と患者の予後との関係が検討された結果、V E G F 高発現腫瘍は、低発現腫瘍に比べて腫瘍血管新生が盛んであり、生存率が低いことが明らかとなっている (M. Toi ら ; Jpn. J. Cancer Res., 85, 1045, 1994)。

V E G F を認識する抗体は、該抗体を用いた、免疫組織染色による腫瘍組織で発現される V E G F の解析 (T. Shibuya ら ; Clinical Cancer Research, 4, 1483-1487, 1998; Y. Kitadai ら ; Clinical Cancer Research, 4, 2195-2200, 1998)、免疫学的検出法である ELISA 法による腫瘍組織又は血清中の V E G F 測定 (G. Gasparini ら ; Journal of the National Cancer Institute, 89, 139-147, 1997; S. Kondo ら ; Biochimica et Biophysica Acta, 1221, 211-214, 1994) 等に用いることができるため、組織診断等の診断に重要であると考えられている。

ヌードマウスにヒト腫瘍を皮下移植したゼノグラフトモデル実験系において、抗 V E G F モノクローナル抗体は腫瘍増殖抑制効果を示すことが報告されている (J. K. Kim ら ; Nature, 362, 841, 1993)。また、ヌードマウスにおけるヒト腫瘍の転移癌モデルにおいて、抗 V E G F モノクローナル抗体は癌転移を抑制できることが報告されている (O. Melnyk ら ; Cancer Research, 56, 921, 1996)。

さらに、V E G F をコードする DNA のアンチセンス DNA を使い、ヌードマウス移植腫瘍モデルの腫瘍増殖が抑制できることが報告されている (M. Saleh ら, Cancer Research, 56, 393-401, 1996)。従って、V E G F 活性を抑制することができれば、癌患者における腫瘍の増殖又は転移形成を抑制できるものと期待される。

V E G Fは、ヒトの癌性胸水、腹水中に高濃度のV E G Fが検出されることから、胸水、腹水貯留の主要な因子である可能性も示されている (S. Kondoら ; Biochimica et Biophysica Acta, 1221, 211, 1994)。マウスモデルにおいて、抗V E G F抗体によりV E G Fをブロックすることで癌性腹水の貯留を防止できることが示されている (J. C. Luoら, Cancer Research, 58, 2594-2600, 1998.)。

糖尿病性網膜症においては、異常な血管新生により網膜剥離や硝子体出血をおこして失明にいたるが、糖尿病性網膜症における血管新生と患者眼球内のV E G Fレベルが正相関することが報告されている (L. P. Aielloら ; N. Engl. J. Med., 331, 1480, 1994)。また、サルの網膜症モデルにおいて、抗V E G F中和モノクローナル抗体A4. 6. 1の眼内投与によりV E G F活性を抑制すると、血管新生が抑制されることが報告されている (A. P. Adamisら ; Arch Ophthalmol., 114, 66, 1996)。従って、過剰に産生されるV E G F活性を抑制することで糖尿病性網膜症における血管新生を抑制できることが期待される。

慢性関節リュウマチの関節炎の病態の進展 (骨、軟骨の破壊) は血管新生を伴うが、慢性関節リュウマチ患者の関節液中にはV E G Fが高濃度で含まれていること、関節中のマクロファージがV E G Fを産生することが報告されている (A. E. Kochら ; J. Immunol., 152, 4149, 1994; R. A. Favaら ; J. Exp. Med., 180, 341, 1994)。過剰に産生されるV E G F活性を抑制することで関節炎における血管新生を抑制できることが期待される。

また、糖尿病性網膜症と同様に異常な血管新生を伴う眼疾患である未熟児網膜症 (K. Lashkariら ; Am. J. Pathol., 156, 1337-1344)、加齢黄斑変性症 (浅山展也ら ; 日本眼科学会雑誌, 104, 390-395, 2000)、血管新生緑内障 (R. C. Tripathiら ; Ophthalmology, 105, 232-237, 1998) において患者の眼のV E G Fレベルの増加が報告されており、V E G F活性を抗体により抑制することで血管新生を抑制できることが期待される。

また、V E G FはC r o w - F u k a s e 症候群 (O. Watanabeら, Lancet, 347, 702, 1996.)、卵巣過剰刺激症候群 (E. R. Levin, J. Clin. Invest., 102, 1978-1985, 1998)、乾せん等の皮下疾患 (J. Exp. Med., 180, 1141-1146, 1994; J. Immunol., 154, 2801-2807, 1995)、動脈硬化 (Inoue, M. ら, Circulation,

98, 2108-2116, 1998) 等の疾患の発症、進展に関与することが報告されている。

脳梗塞、急性心筋梗塞、末梢動脈閉塞症などの虚血性疾患においては、側副血行路の発達を促進させることにより、虚血を解除して疾患を治療する血管新生療法が試みられている。ウサギ大腿動脈慢性虚血肢モデルにおいて V E G F 蛋白質を投与すると、虚血部位に側副血行路が形成され、下肢血圧の上昇や血流量の増加などの治療効果が認められたと報告されている (S. Takeshita, J. Clin. Invest., 93, 662-670, 1994)。下肢が動脈閉塞した患者に対し、カテーテルを用いた V E G F の c D N A の動脈内投与、又は下肢の筋注を行うことにより側副血行路の再建が確認されたと報告されている (I. Baumgartnerら, Circulation, 97, 1114, 1998)。

血管内皮細胞及び血液細胞は、共通の前駆細胞である血管血液幹細胞より別れて分化することが示されている。血管血液幹細胞には V E G F 受容体である KDR/Flk-1 が発現することから、V E G F は、血管血液幹細胞から血管内皮前駆細胞及び血液前駆細胞への分化に必須な因子である可能性が指摘されている (S. Nishikawaら, Development, 125, 1747-1757, 1998)。血管血液幹細胞を虚血モデル動物に投与すると、該細胞が虚血部位の血管新生に利用されることが報告されている (T. Asaharaら, Science, 275, 964-967, 1997)。

V E G F は血管内皮細胞に極めて高い特異性を示すが、一部の血球細胞、骨芽細胞、膵臓 β 細胞に対する作用も報告されている。ヒト単球細胞には V E G F 受容体 Flt-1 が発現しており、V E G F は単球の遊走促進活性を有することが報告されている (B. Barleonら, Blood, 87, 3336-3343, 1996)。抗原提示細胞として重要なヒト樹状細胞には V E G F 受容体 Flt-1 が発現しており、V E G F は樹状細胞の成熟化を阻害する活性を有することが報告されている。樹状細胞の活性化は免疫による腫瘍破壊において重要なステップであるので、腫瘍細胞より産生される V E G F は、腫瘍免疫抑制により腫瘍増殖を促進していると推測されている (D. M. Garbilovichら, Nature Medicine, 2, 1096-1103, 1996)。V E G F は骨芽細胞に作用し、遊走及び分化を促進することが報告されている (V. Midyら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 199, 380-386, 1994)。また、膵臓の β 細胞に V E G F 受容体 KDR/Flk-1 が発現しており、V E G F が β 細胞の分化に関わって

いる可能性が示されている (C. Obergら, Growth Factors, 10, 115-126, 1994)。

V E G F の類縁因子としては、これまでに P l G F (Placental growth factor) (D. Maglione, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9267-9271, 1991), V E G F - B (B. Olofssonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 2576-2581, 1996), V E G F - C (J. Leeら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 1988-1992, 1996), V E G F - D (M. G. Achen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95, 548-553, 1998), orf ウイルス N Z 2 株および N Z 7 株の V E G F ホモログ (以下それぞれ N Z 2 - V E G F および N Z 7 - V E G F という。D. J. Lyttle, Journal of Virology, 68, 84-92, 1994), P D G F - A (C. Betsholtzら, Nature, 320, 695-699, 1986), P D G F - B (T. Collinsら, Nature, 316, 748-750, 1985) が単離されている。

P D G F は血小板中に存在し、主として間葉系細胞に対する遊走・増殖刺激活性を有する因子として1979年に精製された (Heldin. C. H. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76, 3722-3726, 1979)。P D G F は、A 鎖 (以下 P D G F - A という) 及び B 鎖 (以下 P D G F - B という) と呼ばれる2種類のポリペプチド鎖 (各々の分子量は約3万) がジスルフィド結合により二量体化した構造をとり、3種のアイソフォーム P D G F - AA, AB, BB の存在が報告されている。A 鎖 (Betsholtz, C. ら, Nature, 320, 695-699, 1986) 及び B 鎖 (Collins, T. ら, Nature, 316, 748-750, 1985) の c D N A が単離され、これらの成熟型蛋白質では60%のアミノ酸相同性があり、構造及び活性の保持に必要な8個のシステイン残基の位置は保存されている (Claesson-Welsh, L., J. Biol. Chem., 269, 32023-32026, 1994)。P D G F は、生合成の際、前駆体蛋白質よりA鎖はN末端部分、B鎖はN末端及びC末端部分の切断を受け、成熟型蛋白質となる (Claesson-Welsh, L., J. Biol. Chem., 269, 32023-32026, 1994)。P D G F の断片化、アミノ酸残基の改変等により P D G F 阻害剤を作製することが試みられ、P D G F - B については、116~121及び157~163に対応する13残基よりなるペプチドが、P D G F - B の P D G F 受容体への結合を阻害する活性を有することが報告されている (Engstrom, U. ら, J. Biol. Chem., 267, 16581-16587, 1992)。

P D G F は創傷治癒に関係する細胞群、すなわち、血小板のみならず、マクロ

ファージ、平滑筋細胞、内皮細胞、繊維芽細胞などからも分泌されること、また細胞遊走・増殖刺激活性に加え、コラーゲンなどの細胞外マトリクスの産生、リモデリングに働く酵素の産生を促進することから、創傷治癒過程において重要な働きをしていると考えられている (Ross, R. ら, *Cell*, 46, 155-169, 1986)。ウサギモデルにおいては、PDGF 投与により、皮膚の損傷の修復が促進されることが報告されている (Pierce ら, *Journal of Cellular Biochemistry*, 45, 319-326, 1991)。現在、PDGF は、神経性下肢潰瘍、糖尿病性下肢潰瘍等の、創傷治癒が遅延することにより生じる病態の治療薬として注目されている。

動脈硬化病変形成初期では、損傷を受けた動脈の内膜に集まった血小板及びマクロファージなどから分泌された PDGF が、中膜平滑筋細胞の内膜側への遊走及び内膜での増殖を惹起し、病変を進展させると考えられている (Ross, R. ら, *Science*, 248, 1009-1012, 1990)。さらに、PDGF 抗体投与により、ラット動脈硬化モデルで病態を抑制できたことが報告されている (Ferns G. A. ら, *Science*, 253, 1129-1132, 1991)。

糸球体腎炎の発症・進展において、メサングウム細胞は中心的役割を担っている。ヒトの糸球体腎炎において PDGF の発現が上昇していること (Matsuda, M. ら, *American Journal of Nephrology*, 17, 25-31, 1997)、ラット腎炎モデルに PDGF 中和抗体を投与すると治療効果が認められること (Johnson, R. J. ら, *J. Exp. Med.*, 175, 1413-1416, 1992) が報告されている。

PDGF-B 鎖はサル肉腫ウイルスの癌遺伝子である v-sis プロトオンコジーンであることが判明し (Waterfield, M. D. ら, *Nature*, 304, 35-39, 1983)、発ガン研究の面からも注目されている。PDGF は 26 種の異なるヒト腫瘍由来の 168 種の細胞株が PDGF を発現していること、及びこれら癌細胞のオートクライン、パラクライン増殖因子である可能性があることが報告されている (Potapova, O. ら, *International Journal of Cancer*, 66, 669-677, 1996)。

以上のように、VEGF/PDGF スーパーファミリーに属する増殖因子は、固形腫瘍、腫瘍転移等の異常な血管新生の亢進を伴う疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、血管新生緑内障等の異常な血管新生に基づく眼の疾患、慢性関節リュウマチ等の異常な血管新生に基づく関節炎、乾せん等の異常

な血管新生を伴う皮膚疾患、腹水癌、胸水癌、C r o w - F u k a s e 症候群、
卵巣過剰刺激症候群等の異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、動脈硬化等の平滑
筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、糸球体腎炎等の腎メサンギウム細胞の分化増
殖異常を伴う疾患、貧血等の血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨粗鬆症等
の骨芽細胞の異常に基づく疾患、糖尿病等の膵臓 β 細胞の異常に基づく疾患、脳
梗塞、急性心筋梗塞、末梢動脈閉塞症等の虚血性疾患、神経性下肢潰瘍、糖尿病
性下肢潰瘍等の創傷治癒の遅延を伴う疾患に関与することが示されている。また、
V E G F / P D G F スーパーファミリーに属する増殖因子の活性を阻害できる抗
体、アンチセンスDNA等の阻害剤は、固形腫瘍や腫瘍転移等の異常な血管新生
の亢進を伴う疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、血管新生
緑内障等の異常な血管新生に基づく眼の疾患、慢性関節リュウマチ等の異常な血
管新生に基づく関節炎、乾せん等の異常な血管新生を伴う皮膚疾患、腹水癌、胸
水癌、C r o w - F u k a s e 症候群、卵巣過剰刺激症候群等の異常な血管透過
性の亢進を伴う疾患、動脈硬化等の平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、糸球
体腎炎等の腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患を治療する活性が示さ
れている。さらに、V E G F / P D G F スーパーファミリーに属する増殖因子は、
蛋白質又はそれをコードする遺伝子投与により、脳梗塞、急性心筋梗塞、末梢動
脈閉塞症等の虚血性疾患に対する血管新生療法、神経性下肢潰瘍、糖尿病性下肢
潰瘍等の疾患に対する創傷治癒促進療法に有効であることが示されている。また、
V E G F 受容体は、血液幹細胞、骨芽細胞、膵臓 β 細胞に発現し、それら細胞の
増殖分化に関与する可能性が報告されており、貧血等の血液幹細胞の分化増殖異
常を伴う疾患、骨粗鬆症等の骨芽細胞の異常に基づく疾患、糖尿病等の膵臓 β 細
胞の異常に基づく疾患に対する治療薬になる可能性が示唆されている。従って、
V E G F / P D G F スーパーファミリーに属する因子は有用な新薬開発のター
ゲットとして非常に注目されている。V E G F / P D G F スーパーファミリーに
属する新規な因子が存在する可能性も想起され、これまでにV E G F R E L A
T E D G E N E (W099/37671) 及びV E G F - E (W099/47677) が報告されて
いる。このような新規な因子も新薬開発のターゲットとなるであろうが、特に、
新規な因子の有する活性を阻害する抗体は、該因子の関与する疾患の診断薬、治

療薬等として有用であろう。

発明の開示

本発明の目的は、VEGF/PDGF様因子 (VEGF/PDGF-Like Factor、以下「VPLF」という。) に特異的に反応し、かつVPLFの有する活性を阻害する抗体を提供し、また、VPLFの関与する疾患、例えば、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓β細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患等の、本発明の抗体を用いた治療法又は診断法を提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、VPLFに特異的に反応し、かつVPLFの有する活性を阻害するモノクローナル抗体を取得することに成功し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質を特異的に認識し、かつ該蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する抗体。

(2) 配列番号1における第227アミノ酸～第345アミノ酸に存在するエピトープを認識する(1)記載の抗体。

(3) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質を特異的に認識し、かつ、該蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する抗体。

(4) 配列番号1で示されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質を特異的に認識し、かつ、該蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する抗体。

(5) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列を含み、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子間で保存されている8個のシステイン残基を

含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質を特異的に認識し、かつ、該蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する抗体。

(6) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の部分配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子間で保存されている 8 個のシステイン残基を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質を特異的に認識し、かつ、該蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する抗体。

(7) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において N 末から少なくとも 226 番目までのアミノ酸が欠失されたアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質を特異的に認識し、かつ、該蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する抗体。

(8) 配列番号 32 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質を特異的に認識し、かつ、該蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する抗体。

(9) 配列番号 33 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質を特異的に認識し、かつ、該蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する抗体。

(10) 蛋白質の有する増殖因子としての活性が平滑筋細胞に対する増殖促進活性である (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載の抗体。

(11) 平滑筋細胞が、ラット由来である (10) 記載の抗体。

(12) 抗体がモノクローナル抗体である、(1) ~ (11) のいずれか 1 項に記載の抗体。

(13) モノクローナル抗体がマウスモノクローナル抗体である (12) 記載のモノクローナル抗体。

(14) モノクローナル抗体が IgG1 サブクラスである (12) 記載の抗体。

(15) マウスモノクローナル抗体が IgG1 サブクラスである (13) 記載の抗体。

(16) ハイブリドーマ細胞株 KM2764 (FERM BP-7293) により産生されるモノクローナル抗体。

(17) ハイブリドーマ細胞株 KM2767 (FERM BP-7294) によ

り産生されるモノクローナル抗体。

(18)(12) 記載のモノクローナル抗体の部分断片からなる抗体断片。

(19)(1) ~ (17) のいずれか 1 項に記載の抗体又は (18) 記載の抗体断片と、放射性同位元素、蛋白質又は低分子の薬剤とを結合させた抗体の誘導体。

(20)(1) ~ (17) のいずれか 1 項に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

(21) ハイブリドーマ細胞株 KM2764 (FERM BP-7293) である (20) 記載のハイブリドーマ。

(22) ハイブリドーマ細胞株 KM2767 (FERM BP-7294) である (20) 記載のハイブリドーマ。

(23)(1) ~ (17) のいずれか 1 項に記載の抗体、(18) 記載の抗体断片又は (19) 記載の抗体の誘導体をコードする DNA。

(24)(23) 記載の DNA を含有する組換えベクター。

(25)(24) 記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

(26)(25) 記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に (1) ~ (17) のいずれか 1 項に記載の抗体、(18) 記載の抗体断片又は (19) 記載の誘導体を生成蓄積させ、該培養物から該抗体、該抗体断片又は該誘導体を採取することを特徴とする、抗体、抗体断片又は誘導体の製造方法。

(27)(1) ~ (17) のいずれか 1 項に記載の抗体、(18) 記載の抗体断片又は (19) 記載の抗体の誘導体を含有する医薬。

(28)(1) ~ (17) のいずれか 1 項に記載の抗体、(18) 記載の抗体断片又は (19) 記載の抗体の誘導体を含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患及び腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも 1 種の疾患の治療薬。

(29) 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、

加齢黄斑変性症及び血管新生緑内障からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リュウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、C r o w - F u k a s e 症候群及び卵巣過剰刺激症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎である（28）記載の治療薬。

（30）（1）～（17）のいずれか1項に記載の抗体、（18）記載の抗体断片又は（19）記載の抗体の誘導体を含む、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓β細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも1種の疾患の診断薬。

（31）異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内障からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リュウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、C r o w - F u k a s e 症候群及び卵巣過剰刺激症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎であり、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、膵臓β細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される（30）記載の診断薬。

（32）（1）～（17）のいずれか1項に記載の抗体、（18）記載の抗体断片又は（19）記載の抗体の誘導体を用いて以下の（a）～（j）からなる群より選択される少なくとも1種の蛋白質を免疫学的に定量する方法：

- (a) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質；
 - (b) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；
 - (c) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列と 60 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；
 - (d) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の部分配列を含み、VEGF/PDGF スーパーファミリーに属する因子間で保存されている 8 個のシステイン残基を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；
 - (e) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の部分配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、VEGF/PDGF スーパーファミリーに属する因子間で保存されている 8 個のシステイン残基を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；
 - (f) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において N 末から少なくとも 226 番目までのアミノ酸が欠失されたアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；
 - (g) 配列番号 32 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質；
 - (h) 配列番号 33 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質；
 - (i) 蛋白質の有する増殖因子としての活性が平滑筋細胞に対する増殖促進活性である上記 (a) ~ (h) のいずれかに記載の蛋白質；及び
 - (j) 平滑筋細胞が、ラット由来である上記 (i) に記載の蛋白質。
- (33)(1) ~ (17) のいずれか 1 項に記載の抗体、(18) 記載の抗体断片又は (19) 記載の抗体の誘導体を用いて以下の (a) ~ (j) からなる群より選択される少なくとも 1 種の蛋白質を免疫学的に検出する方法：
- (a) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質；
 - (b) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置

換又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号1で示されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；

(d) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列を含み、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子間で保存されている8個のシステイン残基を含み、かつ配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子間で保存されている8個のシステイン残基を含み、かつ配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号1で示されるアミノ酸配列においてN末から少なくとも226番目までのアミノ酸が欠失されたアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；

(g) 配列番号32で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質；

(h) 配列番号33で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質；

(i) 蛋白質の有する増殖因子としての活性が平滑筋細胞に対する増殖促進活性である上記(a)～(h)のいずれかに記載の蛋白質；及び

(j) 平滑筋細胞が、ラット由来である上記(i)に記載の蛋白質。

(34)(1)～(17)のいずれか1項に記載の抗体、(18)記載の抗体断片又は(19)記載の抗体の誘導体を用いて、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓β細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択され

る少なくとも1種の疾患を検出する方法。

(35) 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内障からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リュウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、C r o w - F u k a s e 症候群及び卵巣過剰刺激症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メサングウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎であり、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、膵臓β細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される(34)記載の方法。

本発明は、V P L F を特異的に認識し、かつV P L F の有する活性を阻害する抗体に関する。

V P L F は、ヒト神経前駆細胞N T - 2 及びヒト卵巣癌組織由来c D N A ライブラリーよりクローニングされたV E G F / P D G F スーパーファミリーに属する新規増殖因子である。

本発明におけるV P L F としては、配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質、配列番号1で示されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ該蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質、並びに配列番号1で示されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ該蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質を挙げることができる。

本発明におけるV P L F としては、さらに、配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列を含み、V E G F / P D G F スーパーファミリーに属する因子間で保存されている8個のシステイン残基を含み、かつ上記V P L F の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質、配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、V

EGF／PDGFスーパーファミリーに属する因子間で保存されている 8 個のシステイン残基を含み、かつ上記 V P L F の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質を挙げることができる。上記部分配列としては、例えば、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において N 末端配列が欠失したアミノ酸配列を挙げることができる。より具体的には、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において 2 2 7 番目のフェニルアラニンから 3 4 5 番目のグリシンまでのアミノ酸配列を挙げることができる。また、このような蛋白質としては、例えば、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において 2 2 7 番目のフェニルアラニンから 3 4 5 番目のグリシンまでのアミノ酸配列を含み、N 末端に 4 アミノ酸 (Asp-Pro-Ser-Pro：配列番号 3 4) が付加されたアミノ酸配列 (配列番号 3 2) を有する蛋白質、または、2 アミノ酸 (Ser-Pro) が付加されたアミノ酸配列 (配列番号 3 3) を有する蛋白質を挙げることができる。

本発明における V P L F は、増殖因子としての活性を有することを特徴とする蛋白質である。本発明における V P L F は、血管内皮細胞の増殖促進活性、遊走促進活性、チューブ形成促進活性、プロテアーゼ産生促進活性、血管新生促進活性、血管透過性亢進活性、血管血液幹細胞の分化・増殖促進活性、単球の遊走促進活性、樹状細胞の成熟阻害活性、平滑筋細胞を含む間葉系細胞に対する遊走・増殖促進活性等の増殖因子としての活性を有し、特に好ましくは、平滑筋細胞に対する増殖促進活性を有する。これまでに昆虫細胞発現 V P L F Δ N (配列番号 1 の 1 ～ 2 2 6 番目のアミノ酸が欠失した N 末欠失体) を用いてヒト未分化造血細胞 (C D 3 4 陽性ヒト骨髓細胞；BIOWHITTAKER 社製)、ヒト皮膚由来微小血管内皮細胞 H M V E C (クラボウ社製)、及びラット由来平滑筋細胞 R S M C (FEB S Letters, 425, 123, 1998) に対する増殖促進活性を検討した結果、R S M C において濃度依存的な増殖活性を示した。

配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ該蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、「モレキュラー・クローニング第 2 版」という)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wile

y & Sons (1987-1997) (以下、「カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー」という)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985) 等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質 (以下「配列番号 1 の V P L F」という) をコードする DNA に部位特異的変異を導入することにより得ることができる。欠失、置換又は付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは 1 個～数十個、例えば、1～20 個、より好ましくは 1 個～数個、例えば、1～5 個のアミノ酸である。また、本発明における V P L F が増殖因子としての機能を有するためには、配列番号 1 記載のアミノ酸配列と少なくとも 60 % 以上の相同性を有することが好ましく、より好ましくは 80 % 以上、さらに好ましくは 95 % 以上の相同性を有する。さらに、このようなアミノ酸の欠失、置換又は付加を導入した場合においても、VEGF/PDGF スーパーファミリーに属する因子間で保存されている 8 個のシステイン残基を含んでいることが好ましい。

配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の部分配列を含む蛋白質は、当業者に公知の方法によって作製することができ、例えば、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA の一部を欠失させ、これを含む発現ベクターを導入した形質転換体を培養することにより作製することができる。また、こうして作製される蛋白質又は DNA に基づいて、上記と同様の方法により、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の部分配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含む蛋白質を得ることができる。

本発明における V P L F をコードする DNA は、例えば配列番号 1 の V P L F をコードする DNA として、配列番号 2 で示される塩基配列を有する DNA が挙げられるが、これに限定されない。一般に 1 つのアミノ酸に対して複数種の遺伝暗号が存在するため、配列番号 2 とは異なる塩基配列を有する DNA であっても、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列をコードするものであれば本発明に用いることができる。さらに、本発明における V P L F のアミノ酸配列は、上述のような配列番号 1 以外ののものであってもよいので、それらの蛋白質をコードする DNA

も本発明に用いることができる。本発明におけるVPLFをコードするDNAとしては、例えば、配列番号2で示される塩基配列を有するDNA、及び該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを挙げることができる。

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、配列番号2で示される塩基配列を有するDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニー又はプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0 mmol/lの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mmol/l塩化ナトリウム、15 mmol/lクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAを挙げることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。より具体的には、ハイブリダイズ可能なDNAとしては、配列番号2で示される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAを挙げることができる。

本明細書において使用したアミノ酸およびその保護基に関する略号は、生化学命名に関するIUPAC-IUB委員会（IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature）の勧告 [European Journal of Biochemistry, 138, p. 9, 1984] に従った。

次に示す略号は、特に断わらない限り対応する次のアミノ酸を表す；Ala: L-アラニン；Arg: L-アルギニン；Asn: L-アスパラギン；Asp: L-アスパラギン酸；Asx: L-アスパラギン酸又はL-アスパラギン；Cys: L-システイン；Gln: L-グルタミン；Glu: L-グルタミン酸；Glx: L-グルタミン酸又はL-グルタミン；Gly: グリシン；Ile: L-イソロイシン；Leu: L-ロイシン；Lys: L-リジン；Phe:

L-フェニルアラニン ; Pro: L-プロリン ; Ser: L-セリン ; Thr: L-スレオニン ; Trp: L-トリプトファン。

また、次に示す略号は、対応する次のアミノ酸の保護基および側鎖保護アミノ酸を表す ; Fmoc: 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル ; tBu: t-ブチル ; Trt: トリチル ; Pmc: 2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル ; Boc: t-ブチルオキシカルボニル ; Fmoc-Arg (Pmc) -OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N^ε-2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル-L-アルギニン ; Fmoc-Asn (Trt) -OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N^γ-トリチル-L-アスパラギン ; Fmoc-Asp (OtBu) -OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸-β-t-ブチルエステル ; Fmoc-Cys (Trt) -OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-S-トリチル-L-システイン ; Fmoc-Gln (Trt) -OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N^ε-トリチル-L-グルタミン ; Fmoc-Glu (OtBu) -OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-グルタミン酸-γ-t-ブチルエステル ; Fmoc-Lys (Boc) -OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N^ε-t-ブチルオキシカルボニル-L-リジン ; Fmoc-Ser (tBu) -OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-O-t-ブチル-L-セリン ; Fmoc-Thr (tBu) -OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-O-t-ブチル-L-スレオニン ; Fmoc-Trp (Boc) -OH: N^α-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N^{ind}-t-ブチルオキシカルボニル-L-トリプトファン。

さらに、次に示す略号は、対応する次の反応溶媒、反応試薬等を表す ; HBTU: 2- (1H-ベンゾトリアゾール-1-イル) -1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム・ヘキサフルオロホスフェート ; DIPIC: N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド ; HOBT: N-ヒドロキシベンゾトリアゾール ; DMF: N, N-ジメチルホルムアミド ; NMP: N-メチルピロリドン ; TFA: トリフルオロ酢酸 ; DIEA: ジイソプロピルエチルアミン。

本明細書に記載される相同性の数値は、特に明示した場合を除き、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、塩基配列については、好ましくはBLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] においてデフォルト (初期設定) のパラメータを用いて算出される数値、アミノ酸配列については、好ましくはBLAST 2 [Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997)] ; G

enome Res., 7, 649 (1997) ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html>] においてデフォルト（初期設定）のパラメータを用いて算出される数値である。

本発明の抗体としては、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体が挙げられ、好ましくはモノクローナル抗体、例えば、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体及びヒト抗体等が挙げられる。

本明細書において「ハイブリドーマ」とは、ヒト以外の哺乳動物に抗原を免疫して取得されたB細胞と、マウス等に由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有するモノクローナル抗体を産生する細胞を意味する。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型相同性決定領域（complementarity determining region、以下「CDR」という。）移植抗体等が挙げられる。

本明細書において「ヒト型キメラ抗体」とは、ヒト以外の動物の抗体重鎖可変領域（重鎖は「H鎖」と称し、可変領域は「V領域」と称するため、以下「HV」又は「VH」という。）及び抗体軽鎖可変領域（軽鎖は「L鎖」と称し、可変領域は「V領域」と称するため、以下「LV」又は「VL」という。）、並びにヒト抗体の重鎖定常領域（重鎖は「H鎖」と称し、定常領域は「C領域」と称するため、以下「CH」という。）及びヒト抗体の軽鎖定常領域（軽鎖は「L鎖」と称し、定常領域は「C領域」と称するため、以下「CL」という。）からなる抗体を意味する。前記ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

本発明のヒト型キメラ抗体は、VPLFに特異的に反応し、かつVPLFの有する活性を阻害するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VH及びVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体CH及びヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入して発現させることにより、製造することができる。

ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン（以下「hIg」とい

う。)に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のC Lとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、 κ クラス又は λ クラスのものを用いることができる。

本明細書において「ヒト型C D R移植抗体」とは、ヒト以外の動物の抗体のV H及びV LのC D Rのアミノ酸配列をヒト抗体のV H及びV Lの適切な位置に移植した抗体を意味する。

本発明のヒト型C D R移植抗体は、V P L Fに特異的に反応し、かつV P L Fの有する活性を阻害するヒト以外の動物の抗体のV H及びV LのC D R配列を、任意のヒト抗体のV H及びV LのC D R配列に移植したV領域をコードするc D N Aを構築し、これらをヒト抗体のC H及びヒト抗体のC Lをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型C D R移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを動物細胞へ導入して発現させることにより、製造することができる。

ヒト型C D R移植抗体のC Hとしては、hIgに属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型C D R移植抗体のC Lとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、 κ クラス又は λ クラスのものを用いることができる。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリー及びヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。

ヒト体内に存在する抗体を取得するためには、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EBウイルス等を感染させて不死化し、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養することができ、その培養物中より該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより、Fab、一本鎖抗体等の抗体断片をファージ

ジ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として、所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2本の完全なH鎖及び2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へ変換することもできる。

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、マウスE S細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該E S細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法としては、例えば、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法により、該トランスジェニック動物からヒト抗体産生ハイブリドーマを得、このハイブリドーマを培養することで培養中にヒト抗体を産生蓄積させる方法が挙げられる。

抗体断片としては、Fab (fragment of antigen binding)、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体 (single chain Fv、以下「scFv」という。)、ジスルフィド安定化抗体 (disulfide stabilized Fv、以下「dsFv」という。)、CDRを含むペプチドなどが挙げられる。

Fabは、IgGを蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち (H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される)、H鎖のN末端側約半分のアミノ酸とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のFabは、VPLFに特異的に反応し、かつVPLFの有する活性を阻害する抗体を蛋白質分解酵素パパインで処理することにより得ることができる。あるいは、該抗体のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させ、Fabを製造することができる。

F(ab')₂は、IgGを蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち (H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される)、Fabがヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を

有する抗体断片である。

本発明の $F(ab')_2$ は、V P L F に特異的に反応し、かつV P L F の有する活性を阻害する抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。あるいは、下記のFab' をチオエーテル結合又はジスルフィド結合させることにより、作製することができる。

Fab' は、上記 $F(ab')_2$ のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のFab' は、V P L F に特異的に反応し、かつV P L F の有する活性を阻害する $F(ab')_2$ を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。あるいは、該抗体のFab' 断片をコードするDNAを原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させ、Fab' を製造することができる。

scFvは、一本のVHと一本のVLとを適当なペプチドリンカー（以下「P」という。）を用いて連結した、VH-P-VL又はVL-P-VHポリペプチドを示す。本発明のscFvに含まれるVH及びVLとしては、本発明のハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれをも用いることができる。

本発明のscFvは、V P L F に特異的に反応し、かつV P L F の有する活性を阻害する抗体のVH及びVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物又は真核生物へ導入して発現させることにより、製造することができる。

dsFvは、VH及びVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものである。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法 [Protein Engineering, 7, 697 (1994)] に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明のdsFvに含まれるVH及びVLとしては、本発明のハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれをも用いることができる。

本発明のdsFvは、V P L F に特異的に反応し、かつV P L F の有する活性を阻

害する抗体のVH及びVLをコードするcDNAを取得し、dsFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物又は真核生物へ導入して発現させることにより、製造することができる。

CDRを含むペプチドは、H鎖又はL鎖CDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRは、直接又は適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

本発明のCDRを含むペプチドは、VPLFに特異的に反応し、かつVPLFの有する活性を阻害する抗体のVH及びVLをコードするcDNAを取得した後、CDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物又は真核生物へ導入して発現させることにより、製造することができる。

また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によって製造することもできる。

本発明の抗体の誘導体は、本発明のハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、若しくはヒト抗体又はそれらの抗体断片に放射性同位元素、蛋白質若しくは低分子の化合物などを結合させた抗体である。

本発明の抗体の誘導体は、VPLFに特異的に反応し、かつVPLFの有する活性を阻害する抗体又は抗体断片のH鎖又はL鎖のN末端側又はC末端側、抗体又は抗体断片中の適当な置換基又は側鎖、さらには抗体又は抗体断片中の糖鎖に放射性同位元素、蛋白質又は低分子の化合物などを化学的手法〔抗体工学入門（金光修著 1994年 （株）地人書館）〕により結合させることにより製造することができる。

あるいは、本発明の抗体の誘導体は、VPLFに特異的に反応し、かつVPLFの有する活性を阻害する抗体又は抗体断片をコードするDNAと、結合させたい蛋白質をコードするDNAを連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入するという遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

上記放射性同位元素としては、 ^{131}I 、 ^{125}I 等が挙げられ、例えば、クロラミンT法等により、抗体に結合させることができる。

上記低分子の化合物（薬剤）としては、ナイトロジェン・マスタード、サイクロフォスファミド等のアルキル化剤、5-フルオロウラシル、メソトレキセート等の代謝拮抗剤、ダウノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシンC、ダウノルビシン、ドキソルビシン等の抗生物質、ピンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン等の植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタゾン等のホルモン剤等の抗癌剤〔臨床腫瘍学（日本臨床腫瘍研究会編 1996年 癌と化学療法社）〕、又はハイドロコチゾン、プレドニゾン等のステロイド剤、アスピリン、インドメタシン等の非ステロイド剤、金チオマレート、ペニシラミン等の免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリン等の免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマシチン等の抗ヒスタミン剤等の抗炎症剤〔炎症と抗炎症療法 昭和57年 医歯薬出版株式会社〕などが挙げられる。例えば、ダウノマイシンと抗体を結合させる方法としては、グルタルアルデヒドを介してダウノマイシンと抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介してダウノマイシンのアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法等が挙げられる。

上記蛋白質としては、免疫担当細胞を活性化するサイトカインが好適であり、例えば、ヒトインターロイキン-2（以下「hIL-2」という。）、ヒト顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（以下「hGM-CSF」という。）、ヒトマクロファージコロニー刺激因子（以下「hM-CSF」という。）、ヒトインターロイキン12（以下「hIL-12」という。）等が挙げられる。また、癌細胞を直接障害するため、リシンやジフテリア毒素などの毒素を用いることができる。例えば、蛋白質との融合抗体は、抗体又は抗体断片をコードするcDNAに蛋白質をコードするcDNAを連結させ、融合抗体をコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させることにより製造することができる。

以下に、本発明を詳細に説明する。

1. 本発明におけるVP LFをコードするDNAの調製

本発明におけるVPLFをコードするDNAは、ヒト卵巣又は精巣由来のmRNAを単離し、そのcDNAライブラリーを作製し、次いで該cDNAライブラリーをスクリーニングして目的のクローンを得ることにより調製することができる。

ヒト卵巣又は精巣mRNAは、市販のもの（例えば、Clontech社製）を用いてもよいし、以下のごとくヒト卵巣若しくは卵巣癌組織（以下、「卵巣由来組織」という）又はヒト精巣若しくはヒト胎児精巣由来テラトカルシノーマ（以下、「精巣由来組織」という）から調製してもよい。後者の場合には、まず卵巣由来組織又は精巣由来組織から全RNAを調製し、該全RNAからmRNAを単離することができる。

卵巣由来組織又は精巣由来組織から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン・トリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)]、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、実験医学、9, 1937 (1991)] 等が挙げられる。全RNAからpoly (A)⁺ RNAとしてmRNAを単離する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法（モレキュラー・クローニング第2版）等が挙げられる。あるいは、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社) 等のキットを用いることによりmRNAを調製することができる。

調製したヒト卵巣由来組織又は精巣由来組織mRNAからcDNAライブラリーを作製する。cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法、又は市販のキット、例えば、SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies社)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE社) 等を用いる方法などが挙げられる。

cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等、いずれのものでも使用できる。具体的には、ZAP Express [STRATAGENE社、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Resea

rch, 17, 9494 (1989)], Lambda ZAP II (STRATAGENE社)、 λ gt10、 λ gt11 [DNA cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)], λ TriplEx (Clontech社)、 λ ExCell (Pharmacia社)、pT7T318U (Pharmacia社)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)] 及びpUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] 等を挙げることができる。

宿主微生物としては、エシェリヒア属 (*Escherichia*) に属する微生物、特にエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*、以下「大腸菌」という。) に属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、大腸菌 XL1-Blue MR F' [STRATAGENE社, Strategies, 5, 81 (1992)], 大腸菌 C600 [Genetics, 39, 440 (1954)], 大腸菌 Y1088 [Science, 222, 778 (1983)], 大腸菌 Y1090 [Science, 222, 778 (1983)], 大腸菌 NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)], 大腸菌 K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)] 及び大腸菌 JM105 [Gene, 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

このcDNAライブラリーを、そのまま以降のスクリーニングに用いてもよいが、不完全長cDNAの割合を下げ、完全長cDNAをできるだけ効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法 [Gene, 138, 171 (1994); Gene, 200, 149 (1997); 蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996); 実験医学, 11, 2491 (1993); cDNAクローニング、羊土社 (1996); 遺伝子ライブラリーの作製法、羊土社 (1994)] を用いて調製したcDNAライブラリーを以下のスクリーニングに用いてもよい。

cDNAライブラリーのスクリーニングは、まず該ライブラリーに含まれる全クローンの塩基配列決定を行い、次いでそれぞれの塩基配列を既知の配列と比較することにより行う。上記全クローンの塩基配列決定は、上述のようにして作製したcDNAライブラリーから各クローンを単離し、それぞれのクローンについてcDNAの塩基配列を末端から決定することにより行うことができる。cDNAライブラリーからの各クローンの単離は、当業者に公知の方法、例えば、単一コロニー単離法 (モレキュラー・クローニング第2版) 等により行うことができる。また、各クローンの塩基配列決定は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばSangerらのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] により、又はABI PRISM 377 DNAシーケンサー (PE Biosystem

s社製)等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより行うことができる。

次いで、各クローンの塩基配列を既知の配列と比較する。それぞれのcDNAの塩基配列が新規な配列かどうかは、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBL及びDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより、データベース中の既存の遺伝子の塩基配列と一致すると考えられるような明らかな相同性を示す塩基配列がないことにより確認できる。このような方法で得られる新規なDNAの塩基配列として、例えば、配列番号2で示される塩基配列が挙げられる。

配列番号2で示される塩基配列からなるDNAを翻訳して得られるVPLFのアミノ酸配列(配列番号1)は、BLAST2を用いた相同性解析において、VEGFファミリーに属するヒトVEGF、ヒトVEGF-B、ヒトVEGF-C、ヒトVEGF-D及びヒトPLGFのアミノ酸配列、並びにPDGFファミリーに属するヒトPDGF-A及びヒトPDGF-Bのアミノ酸配列と、それぞれ29%、29%、25%、29%、26%、36%及び28%の相同性を有する。また、同じVEGF/PDGFスーパーファミリーに属するNZ2-VEGF及びNZ7-VEGFのアミノ酸配列とも、それぞれ29%及び30%の相同性を有する。

VEGF/PDGFスーパーファミリーにおいては、ダイマー間のジスルフィド結合形成、蛋白質分子内のジスルフィド結合形成、及び活性発現に重要な8個のシステイン残基が存在し(J. Biol. Chem., 269, 32879-32885, 1994)、これら8個のシステイン残基は、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子間で保存されていることが知られている。配列番号1で示されるアミノ酸配列においても、該モチーフを形成するために必須なシステイン残基の位置と数が完全に保存されている。従って、配列番号1のVPLFがVEGF/PDGFスーパーファミリーに属する増殖因子としての活性を有することは明白である。

VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する増殖因子は、固形腫瘍、腫瘍転移等の異常な血管新生の亢進を伴う疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、血管新生緑内障等の異常な血管新生に基づく眼の疾患、慢性関節リウマチ等の異常な血管新生に基づく関節炎、乾せん等の異常な血管新生を伴

う皮膚疾患、腹水癌、胸水癌、C r o w - F u k a s e 症候群、卵巢過剰刺激症候群等の異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、動脈硬化等の平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、糸球体腎炎等の腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、貧血等の血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨粗鬆症等の骨芽細胞の異常に基づく疾患、糖尿病等の膵臓 β 細胞の異常に基づく疾患、脳梗塞、急性心筋梗塞、末梢動脈閉塞症等の虚血性疾患、神経性下肢潰瘍、糖尿病性下肢潰瘍等の創傷治癒の遅延を伴う疾患に関与することが示されている。V P L F の増殖因子の活性を阻害できる抗体は、V P L F を検出および定量できるので、固形腫瘍、腫瘍転移等の異常な血管新生の亢進を伴う疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、血管新生緑内障等の異常な血管新生に基づく眼の疾患、慢性関節リュウマチ等の異常な血管新生に基づく関節炎、乾せん等の異常な血管新生を伴う皮膚疾患、腹水癌、胸水癌、C r o w - F u k a s e 症候群、卵巢過剰刺激症候群等の異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、動脈硬化等の平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、糸球体腎炎等の腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、貧血等の血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨粗鬆症等の骨芽細胞の異常に基づく疾患、糖尿病等の膵臓 β 細胞の異常に基づく疾患、脳梗塞、急性心筋梗塞、末梢動脈閉塞症等の虚血性疾患、神経性下肢潰瘍、糖尿病性下肢潰瘍等の創傷治癒の遅延を伴う疾患の診断薬となりうる。また、V E G F / P D G F スーパーファミリーに属する増殖因子の活性を阻害できる抗体は、固形腫瘍や腫瘍転移等の異常な血管新生の亢進を伴う疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、血管新生緑内障等の異常な血管新生に基づく眼の疾患、慢性関節リュウマチ等の異常な血管新生に基づく関節炎、乾せん等の異常な血管新生を伴う皮膚疾患、腹水癌、胸水癌、C r o w - F u k a s e 症候群、卵巢過剰刺激症候群等の異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、動脈硬化等の平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、糸球体腎炎等の腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患を治療する活性が示されている。従って、V P L F の増殖因子の活性を阻害できる抗体は、固形腫瘍や腫瘍転移等の異常な血管新生の亢進を伴う疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、血管新生緑内障等の異常な血管新生に基づく眼の疾患、慢性関節リュウマチ等の異常な血管新生に基づく関節炎、

乾せん等の異常な血管新生を伴う皮膚疾患、腹水癌、胸水癌、C r o w - F u k a s e 症候群、卵巣過剰刺激症候群等の異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、動脈硬化等の平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、糸球体腎炎等の腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患の治療薬となりうる。

配列番号 2 で示される塩基配列からなる DNA が一旦取得され、その塩基配列が決定された後は、該塩基配列の 5' 端及び 3' 端の塩基配列に基づいて設計したプライマーを調製し、ヒト又は非ヒト動物の卵巣、精巣等の組織又は細胞に含まれる mRNA から合成した c DNA 又は c DNA ライブラリーを鋳型として、PCR 法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)] を用いて DNA の増幅を行うことにより、本発明における V P L F をコードする DNA を取得することができる。

また、配列番号 2 で示される DNA の全長又は一部をプローブとして、ヒト又は非ヒト動物の卵巣、精巣等の組織又は細胞に含まれる mRNA から合成した c DNA 又は c DNA ライブラリー対してコロニーハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーション（モレキュラー・クローニング第 2 版）等を行うことにより、本発明における V P L F をコードする DNA を取得することができる。

あるいは、決定された DNA の塩基配列に基づいて、ホスホアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社の DNA 合成機 model 392 等の DNA 合成機で化学合成することにより、本発明における V P L F をコードする DNA を取得することもできる。

取得した DNA について、該 DNA を含む組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体を用いて蛋白質を発現させることにより、又は該 DNA がコードするアミノ酸配列と V E G F、V E G F - B、V E G F - C、V E G F - D、P D G F - A、P D G F - B、P l G F、N Z 2 - V E G F 若しくは N Z 7 - V E G F のアミノ酸配列との相同性を比較することにより、該 DNA が増殖因子としての活性を有する蛋白質をコードする DNA であることを確認することができる。

2. 本発明における V P L F の製造

本発明における V P L F は、モレキュラー・クローニング第 2 版やカレント・

プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、これをコードするDNAを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

まず、全長cDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。この際、もし必要であれば、全長cDNAをもとにして本発明の蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製し、上記全長cDNAの代わりに該DNA断片を使用してもよい。次いで、該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、本発明におけるVP LFを生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれをも用いることができる。

発現ベクターとしては、使用する宿主細胞において自立複製可能又は染色体中への組込が可能で、本発明におけるVP LFをコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合には、本発明におけるVP LFをコードするDNAを含有してなる組換えベクターは、原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA及び転写終結配列を含むベクターであることが好ましい。該組換えベクターは、さらに、プロモーターを制御する遺伝子を含んでいてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（Pharmacia社）、pSE280（Invitrogen社）、pGEMEX-1（Promega社）、pQE-8（QIAGEN社）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-)（Stratagene社）、pTrs30 [大腸菌 JM109/pTrS30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrs32 [大腸菌 JM109/pTrS32 (FERM BP-5408) より調製]、pGHA2 [大腸菌 IGHA2 (FERM BP-400) より調製、特開昭60-221091]、pGKA2 [大腸菌 IGKA2 (FERM BP-6798) より調製、特開昭60-221091]、pTerm2 (US 4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J.

Bacteriol., 172, 2392 (1990)], pGEX (Pharmacia社)、pETシステム (Novagen社)、pSupex等を挙げることができる。

プロモーターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (P_{trp})、lacプロモーター、 P_L プロモーター、 P_R プロモーター、T7プロモーター等の、大腸菌やファージ等由来するプロモーターを挙げることができる。また、 P_{trp} を2つ直列させたプロモーター ($P_{trp} \times 2$)、lacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーター等のように、人為的に設計改変されたプロモーターなども用いることができる。

また、上記組換えベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャインーダールガルノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6～18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。本発明におけるV P L FをコードするDNAの塩基配列においては、宿主内での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができ、これにより、目的とする蛋白質の生産率を向上させることができる。さらに、上記組換えベクターにおいては、本発明におけるV P L FをコードするDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、大腸菌 XL1-Blue、大腸菌 XL2-Blue、大腸菌 DH1、大腸菌 MC1000、大腸菌 KY3276、大腸菌 W1485、大腸菌 JM109、大腸菌 HB101、大腸菌 No. 49、大腸菌 W3110、大腸菌 NY49、セラチア・フィカリア (*Serratia ficaria*)、セラチア・フォンチコラ (*S. fonticola*)、セラチア・リクエファシエンス (*S. liquefaciens*)、セラチア・マルセセンス (*S. marcescens*)、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・アミロリクエファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、ブレビバクテリウム・インマリオフィルムATCC C14068 (*Brevibacterium immariophilum* ATCC14068)、ブレビバクテリウム・サッカロリティカムATCC14066 (*B. saccharolyticum* ATCC14066)、ブレビバクテリウム・フラブムATCC14067 (*B. flavum* ATCC14067)、ブレビバクテリウム・ラ

クトファーメントムATCC13869 (B. lactofermentum ATCC13869)、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032 (Corynebacterium glutamicum ATCC13032)、コリネバクテリウム・アセトアシドフィルムATCC13870 (C. acetoacidophilum ATCC13870)、ミクロバクテリウム・アンモニアフィルムATCC15354 (Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354)、シュードモナスsp. D-0110 (Pseudomonas sp. D-0110) 等を挙げることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-248394)、Gene, 17, 107 (1982) やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979) に記載の方法等を挙げることができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419) 等を挙げることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で機能を発揮できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP1プロモーター等を挙げることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス属、クリュイベロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)、クリュイベロミセス・ラクティス (Kluyveromyces lactis)、トリコスポロン・プルランス (Trichosporon pullulans)、シュワニオミセス・アルビウス (Schwanniomyces alluvius) 等を挙げることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84,

1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriology, 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) 記載の方法等を挙げることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p c DNAI、p c DM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840, (1987)]、p c DNAI/Amp (Invitrogen社)、pREP4 (Invitrogen社)、pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAGE210等を挙げることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等を挙げることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299) 等を挙げることができる。組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等を挙げることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、Bio/Technology, 6, 47 (1988) 等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクター及びバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにInvitrogen社) 等を挙げることができる。バキュ

ロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフファ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) の卵巣細胞であるSf9、Sf21 [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、トリチョプルシア・ニ (*Trichoplusia ni*) の卵巣細胞であるHigh 5 (Invitrogen社) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等を挙げることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等を挙げることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等を挙げることができる。

宿主細胞としては、例えば、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞を挙げることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977)、エレクトロポレーション法 (特開昭60-251887)、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (特許第2606856、特許第2517813) 等を挙げることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞、昆虫細胞又は植物細胞により発現させた場合には、糖あるい

は糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明におけるVPLFを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明におけるVPLFを製造することができる。該形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物又は酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含出し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地及び合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含する糖蜜、デンプン、デンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類などを用いることができる。

窒素源としては、該生物が資化し得るものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕及び大豆粕加水分解物、各種発酵菌体及びその消化物等を用いることができる。

無機塩類としては、該生物が資化し得るものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養又は深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機又は有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)] 又はこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 (Pharminogen社)、Sf-900 II SFM培地 (Life Technologies社)、ExCell400、ExCell405 (いずれもJRH Biosciences社)、Grace's Insect Medium [Grace, T. C. C., Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として又は植物の細胞若しくは器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ (MS) 培地、ホワイト (White) 培地、又はこれらの培地にオーキシン、サイトカイニンその他の植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 5～9、20～40℃の条件下で3～60日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、本発明におけるV P L FをコードするD N Aを組み込んだ組換えベクターを保有する微生物、動物細胞又は植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該V P L Fを生成蓄積させ、該培養物より該V P L Fを採取することにより、該V P L Fを製造することができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

本発明におけるV P L Fの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、及び宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる蛋白質の構造を変えることにより、適切な方法を選択することができる。

本発明におけるV P L Fが宿主細胞内又は宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、又は特開平05-336963、W094/23021等に記載の方法を準用することにより、該V P L Fを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明におけるV P L Fの活性部位を含む蛋白質のN末端側にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明におけるV P L Fを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

さらに、遺伝子導入した動物又は植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体（トランスジェニック非ヒト動物）又は植物個体（トランスジェニック植物）を作製し、これらの個体を用いて本発明におけるV P L Fを製造することもできる。

形質転換体が動物個体又は植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育又は栽培し、該V P L Fを生成蓄積させ、該動物個体又は植物個体より該V P L Fを採取することにより、該V P L Fを製造することができる。

動物個体を用いて本発明におけるV P L Fを製造する方法としては、例えば、

公知の方法 [American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996)、American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S (1996)、Bio/Technology, 9, 830 (1991)] に準じて遺伝子を導入して作製した動物中に本発明における V P L F を生産する方法が挙げられる。

動物個体を用いる場合には、例えば、本発明における V P L F をコードする D N A を導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、該蛋白質を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該 V P L F を採取することにより、該 V P L F を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭63-309192）、卵等を挙げることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである α カゼインプロモーター、 β カゼインプロモーター、 β ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

植物個体を用いて本発明における V P L F を製造する方法としては、例えば、本発明における V P L F をコードする D N A を導入したトランスジェニック植物を公知の方法 [組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (1995)、Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)] に準じて栽培し、該 V P L F を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該 V P L F を採取することにより、該 V P L F を生産する方法が挙げられる。

本発明における形質転換体により製造された V P L F は、例えば、以下のようにして単離・精製することができる。本発明における V P L F が細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後に細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化成社) 等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia社) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニ

ルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独又は組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該V P L Fが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として蛋白質の不溶体を回収する。回収した蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈又は透析することにより、該蛋白質を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該V P L Fの精製標品を得ることができる。

本発明におけるV P L F又はその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清において該V P L F又はその糖修飾体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

このようにして取得されるV P L Fとして、例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するV P L Fを挙げることができる。

また、本発明におけるV P L Fは、F m o c法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、t B o c法（tert-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech社、パーキン・エルマー社、Pharmacia社、Protein Technology Instrument社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

3. 抗V P L Fモノクローナル抗体の作製

(1) 抗原の調製

1. に記載した方法でV P L FをコードするDNAを調製し、2. に記載した方法で該DNAを含む発現ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等に導入してリコンビナントV P L F蛋白質を得る。あるいはV P L Fを発現しているヒト株化細胞等からV P L Fを精製する。あるいは、V P L F部分配列を有する合成ペプチドを抗原に用いることもできる。

これら抗原は、そのまま投与するか、又はキーホールリンペットヘモシアニン (K L H)、牛血清アルブミン (B S A)、メチル化牛血清アルブミン (メチル化 B S A)、牛サイログロブリン (T H Y) 等の分子量の大きいキャリアタンパク質と結合させて投与する。

(2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

免疫に用いる動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものを用いてもよい。以下に、マウス及びラットを用いる例を説明する。

3～20週令のマウス又はラットに、上記(1)で調製した抗原を免疫し、その動物の脾、リンパ節、末梢血より抗体産生細胞を採取する。免疫は、動物の皮下、静脈内又は腹腔内に、適当なアジュバントとともに抗原を数回投与することにより行う。アジュバントとしては、フロインドの完全アジュバント (Complete Freund's Adjuvant)、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチン等が挙げられる。各投与後3～7日目に、免疫動物の眼底静脈叢又は尾静脈より採血し、抗原として用いたV P L Fに対する反応性を酵素免疫測定法等により確認し [酵素免疫測定法 (ELISA法): 医学書院刊 (1976年)]、その血清が十分な抗体価を示したマウス又はラットを抗体産生細胞の供給源とする。抗原物質の最終投与後3～7日目に、免疫したマウス又はラットより公知の方法 [アンティボディズ・ア・ラボラトリー・マニュアル、コールド・スプリングハーバー・ラボラトリー (Antibodies-A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)、以下「アンチボディズ・ア・ラボラトリー・マニュアル」という。] に準じて脾臓を摘出し、後に行う脾細胞と骨髓腫細胞との融合に用いる。

(3) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) [Euro. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14 (SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653 (653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8 (X63) [Nature, 256, 495 (1975)] など、イン・ビトロ (in vitro) で増殖可能な骨髓腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養及び継代については公知の方法

(アンチボディズ・ア・ラボラトリー・マニュアル)に従い、細胞融合時まで
に 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

(4) 細胞融合

上記(2)及び(3)で得られた抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを洗浄した後、
ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000)などの細胞凝集性媒体を加え、細胞
を融合させ、培地中に懸濁させる。細胞の洗浄にはMEM培地、PBS (リン酸
二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH
7.2)等を用いる。また、融合細胞を懸濁させる培地としては、目的の融合細胞
のみを選択的に得られるように、HAT培地 {正常培地 [RPMI1640培地にグルタ
ミン(1.5mmol/l)、2-メルカプトエタノール(5×10^{-5} mol/l)、ジェ
ンタマイシン(10 μ g/ml)及び牛胎児血清(FCS)(CSL社製、10%)を加えた培地]
にヒポキサンチン(10^{-4} mol/l)、チミジン(1.5×10^{-5} mol/l)及びア
ミノプテリン(4×10^{-7} mol/l)を加えた培地}を用いる。

培養後、培養上清の一部をとり、酵素免疫測定法により、抗原蛋白質に反応し、
非抗原蛋白質に反応しないサンプルを選択する。次いで、限界希釈法によりク
ローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたもの
をモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

(5) ハイブリドーマ産生抗VP LFモノクローナル抗体の選択

抗VP LFモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択は、アンチボ
ディズ・ア・ラボラトリー・マニュアルに述べられている方法などに従い、以下
に述べる測定法により行う。

バインディングELISA

抗原又は抗原を発現した細胞などを96ウェルプレートにコートし、ハイブリ
ドーマ培養上清又は上述の方法(具体的手順については以下の(6)を参照され
たい。)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させる。

第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。

第二抗体とは、第一抗体のイムノグロブリンを認識できる抗体を、ビオチン、
酵素、化学発光物質、放射性化合物等で標識した抗体である。具体的には、上記
(2)の抗体産生細胞作製においてマウスを用いたのであれば、第二抗体として

は、マウスイムノグロブリンを認識できる抗体を用いる。

反応後、第二抗体の標識の種類に応じた検出反応を行い、抗原に特異的に反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

(6) モノクローナル抗体の精製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8~10週令のマウス又はヌードマウスに、上記(4)で得られた抗VPLFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。該マウス又はヌードマウスから腹水を採取し、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、プロテインA-カラム、セルロファインGSL2000(生化学工業社製)のカラム等を用いて、IgG又はIgM画分を回収し、精製モノクローナル抗体とする。

精製モノクローナル抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキット又はラットモノクローナル抗体タイピングキットなどを用いて行うことができる。蛋白質量は、ローリー法により、又は280nmでの吸光度より算出することができる。

抗体のサブクラスとは、クラス内のアイソタイプのこと、マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4が挙げられる。

(7) 抗VPLFモノクローナル抗体の反応特異性

上記(5)で選択された抗VPLFモノクローナル抗体の反応特異性は、上記(5)に示したバインディングELISAにより確認する。その際、96ウェルプレートにコートする抗原として、VPLFの他にVEGFやPDGFを用いることにより、抗VPLFモノクローナル抗体がVPLFに特異的な反応性を有するか否かを検討することができる。

(8) 抗VPLFモノクローナル抗体のVPLF生物活性に対する阻害活性の測定

VPLFのラット由来平滑筋細胞RSMCに及ぼす増殖促進活性を用いて、抗ヒトVPLFモノクローナル抗体がVPLF阻害活性を有するか否かを調べることができる。

すなわち、96ウェル培養プレートにRSMCを一定の細胞濃度でまき、抗ヒトVPLFモノクローナル抗体を加え、さらにVPLFを添加して、CO₂インキュベーター中、37℃で2日間培養する。培養終了後、WST-1反応試薬（ベーリンガーマンハイム社製）等の生細胞数に応じて呈色する試薬を添加し、吸光値を測定することにより生細胞数を定量する。VPLF添加により誘導されたRSMCの増殖（生細胞数の増加）が抗VPLFモノクローナル抗体により抑制されるか否かを検討することにより、抗VPLFモノクローナル抗体の阻害活性の有無を判断することができる。

4. 本発明の抗体を用いてVPLFを免疫学的に検出する方法

本発明の抗体若しくはその抗体断片、又はこれらの誘導体を用い、抗原抗体反応を行わせることにより、VPLF又はVPLFを含む組織を免疫学的に検出することができる。該検出法は、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓β細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患、創傷治癒の遅延を伴う疾患等、VPLFが関与する疾患、例えば、VPLFをコードする遺伝子の変異が原因となっている疾患の診断に利用することができる。また、該検出方法は、VPLFの定量にも用いられる。

免疫学的に検出する方法としては、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法（ELISA）、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、免疫組織染色法、免疫細胞染色法、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、酵素免疫測定法、サンドイッチELISA法〔単クローン抗体実験マニュアル（講談社サイエンティフィック、1987年）、続生化学実験講座5 免疫生化学研究法（東京化学同人、1986年）〕などを用いることができる。

蛍光抗体法は、文献〔Monoclonal Antibodies: Principles and practice, Third edition (Academic Press, 1996)；単クローン抗体実験マニュアル（講談社サイエンティフィック、1987）〕等に記載された方法を用いて行うことができる。具体的には、分離した細胞又は組織などに、本発明の抗体を反応させ、さらにフ

ルオレシン・イソチシアネート (FITC) 又はフィコエリスリンなどの蛍光物質で標識した抗イムノグロブリン抗体又は結合断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

免疫酵素抗体法 (ELISA) は、抗原又は抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ等の酵素標識、ビオチン標識などを施した抗イムノグロブリン抗体又は結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

放射性物質標識免疫抗体法 (RIA) は、抗原又は抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体又は結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法である。

免疫細胞染色法及び免疫組織染色法は、抗原又は抗原を発現した細胞などに本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシン・イソチシアネート (FITC) 等の蛍光物質、ペルオキシダーゼ等の酵素標識、ビオチン標識などを施した抗イムノグロブリン抗体又は結合断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法であり、文献 [Monoclonal Antibodies: Principles and practice, Third edition (Academic Press, 1996) ; 単クローン抗体実験マニュアル (講談社サイエンティフィック, 1987)] 等に記載された方法を用いて行うことができる。

ウェスタンブロッティング法は、抗原又は抗原を発現した細胞などをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988] で分画した後、該ゲルをPVDF膜又はニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片を反応させ、さらにFITC等の蛍光物質、ペルオキシダーゼ等の酵素標識、ビオチン標識などを施した抗マウスIgG抗体又は結合断片を反応させた後、該標識を可視化することによって確認する方法である。

免疫沈降法とは、抗原又は抗原を発現した細胞などを本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片と反応させた後、プロテインGーセファロース等のイムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる方法である。

サンドイッチELISA法は、抗原に対する2種類の抗体を用いて抗原濃度を定量するELISA法である。該ELISA法では、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片であって、抗原認識部位の異なる2種類のモノクローナル抗体を準備し、そのうち、一方のモノクローナル抗体又は抗体断片を予めプレート（例えば、96ウェルプレート）に吸着させ、他方のモノクローナル抗体又は抗体断片をFITC等の蛍光物質、ペルオキシダーゼ等の酵素、ビオチンなどで標識しておく。上記の抗体吸着プレートに、生体内から分離された、細胞又はその破砕液、組織又はその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液等を反応させた後、標識したモノクローナル抗体又はその抗体断片を反応させ、標識物質に応じた検出反応を行う。濃度既知のVPLF蛋白質を段階的に希釈して作製した検量線より、被験サンプルの濃度を算出することができる。

診断は以下のようにして行うことができる。複数の健常者の生体から採取した組織、血液、血清、胸水、腹水、眼液等の生体試料について、本発明の抗体若しくはその抗体断片、またはこれらの誘導体を用い、上記の免疫学的検出方法を用いて、VPLFの定量を行い、健常者の生体試料中のVPLFの発現レベルを調べておく。被験者の生体試料中についても同様にVPLFの定量を行い、その発現レベルを健常者の発現レベルと比較する。異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メサングウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患等のVPLFの発現の増加が見られる疾患では、被験者の発現レベルが健常者と比較して増加している場合に陽性と診断できる。血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓β細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患、創傷治療の遅延を伴う疾患等のVPLFの減少が見られる疾患では、被験者の発現レベルが健常者と比較して減少している場合に陽性と診断できる。診断に用いる生体試料は、それぞれの疾患について、その疾患に関係する組織又は組織由来の体液等が好ましい。

本発明の抗体若しくはその抗体断片、またはこれらの誘導体を含有する診断薬は、目的の診断法に応じて、抗原抗体反応を行うための試薬、該反応の検出用試

薬を含んでもよい。抗原抗体反応を行うための試薬としては、緩衝剤、塩等が挙げられる。検出用試薬としては、本発明の抗体若しくはその抗体断片、又はこれらの誘導体、または本発明の抗体若しくはその抗体断片、又はこれらの誘導体を認識する標識された二次抗体、標識に対応した基質等の通常の免疫学的検出法に用いられる試薬が挙げられる。

5. 本発明の抗体を含有する医薬

V P L F、例えば配列番号 1 の V P L F は V E G F と高い相同性を示すが、V E G F は固形腫瘍や腫瘍転移等の異常な血管新生の亢進を伴う疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、血管新生緑内障等の異常な血管新生に基づく眼の疾患、慢性関節リュウマチ等の異常な血管新生に基づく関節炎、乾せん等の異常な血管新生を伴う皮膚疾患、腹水癌、胸水癌、C r o w - F u k a s e 症候群、卵巢過剰刺激症候群等の異常な血管透過性の亢進を伴う疾患を進展・増悪させることが報告され、V E G F 抗体はこれら疾患の治療に有用であることが報告されていることから、本発明の抗体若しくはその抗体断片、又はこれらの誘導体、特に配列番号 1 の V P L F に対する抗体若しくはその抗体断片、又はこれらの誘導体は、固形腫瘍や腫瘍転移等の異常な血管新生の亢進を伴う疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、血管新生緑内障等の異常な血管新生に基づく眼の疾患、慢性関節リュウマチ等の異常な血管新生に基づく関節炎、乾せん等の異常な血管新生を伴う皮膚疾患、腹水癌、胸水癌、C r o w - F u k a s e 症候群、卵巢過剰刺激症候群等の異常な血管透過性の亢進を伴う疾患の治療薬になり得る。

また、V P L F、例えば配列番号 1 の V P L F は P D G F と高い相同性を示すが、P D G F は、動脈硬化等の平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、糸球体腎炎等の腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患を進展・増悪させることが報告され、P D G F 抗体はこれら疾患の治療に有用であることが報告されていることから、本発明の抗体若しくはその抗体断片、又はこれらの誘導体、特に配列番号 1 の V P L F に対する抗体若しくはその抗体断片、又はこれらの誘導体は、動脈硬化等の平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、糸球体腎炎等の腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患の治療薬になり得る。

本発明の抗体若しくはその抗体断片、又はこれらの誘導体を含む治療薬は、有効成分としての該抗体若しくはその抗体断片、又はこれらの誘導体のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される1以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、又は口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内及び静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体又はペプチド製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適切な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤及びシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪又はカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体又はペプチドそのもの、ないしは受容者の口腔及び気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる

担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体及び用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量又は投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g/kg}$ ～ 8mg/kg である。

図面の簡単な説明

第1図 VPLFとVEGF/PDGFファミリーとのアミノ酸配列の比較を示す図である。

第2図 VPLFとESTクローンの関係を示す図である。

第3図 VPLFの疎水性プロットを示す図である。

第4図 RT-PCR法による、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属す因子のヒト組織における発現を解析した結果を示す。

第5図 RT-PCR法による、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属す因子の癌細胞における発現を解析した結果を示す。

第6図 プラスミドpVL-VPLFの構築の手順を示す。

第7図 プラスミドpVL-VPLF Δ Nの構築の手順を示す。

第8図 精製したVPLF Δ Nの還元及び非還元条件下でのSDS-PAGE電気泳動の結果を示す。

第9図 プラスミドpIRES-VPLFの構築の手順を示す。

第10図 プラスミドpAGE248-VPLF及びpAGE210-VPLFの構築の手順を示す。

第11図 動物細胞(PC-9、CH0)を宿主としてVPLFを発現させた結果を示す。

第12図 ヒトCD34陽性細胞に対するVPLF Δ Nの作用を検討した結果を示す。

第13図 ラット平滑筋細胞RSMCに対するVPLF Δ N、VEGF165、PDGF BB、及びIL-5の増殖促進活性を検討した結果を示す。

第14図 ヒト皮膚由来微小血管内皮細胞HMECに対するVPLFΔN、VEGF165、PDGF BB、及びIL-5の増殖促進活性を検討した結果を示す。

第15図 抗ヒトVPLFモノクローナル抗体KM2676の反応特異性を解析した結果を示す。

第16図 ウェスタンブロッティングによるヒトVPLFの検出結果を示す。

第17図 抗ヒトVPLFモノクローナル抗体の反応特異性を示す図である。

第18図 抗VPLFモノクローナル抗体のVEGF及びPDGFに対する交叉反応性を示す図である。

第19図 抗ヒトVPLFモノクローナル抗体によるVPLFのラット由来平滑筋細胞(RSMC)に対する増殖促進活性の阻害を示す図である。

第20図 抗ヒトVPLFモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA系によるヒトVPLFの定量性を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例及び参考例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。ただし、これらの実施例及び参考例は説明のためのものであり、本発明の技術的範囲を制限するものではない。

〔参考例1〕 ヒト神経前駆細胞NT-2及びヒト卵巣癌組織由来cDNAライブラリーの作製

ヒト胎児精巣由来のテラトカルシノーマ細胞であって、レチノイン酸処理により神経細胞に分化可能なNT-2神経前駆細胞(Stratagene社より購入)を用いた。添付マニュアルに従って、NT-2細胞を培養後、レチノイン酸を添加して、さらに2週間培養した。その培養細胞を集めて、文献モレキュラー・クローニング第2版記載の方法によりmRNAを抽出した。さらに、オリゴdTセルロースでpolyA(+)RNAを精製した。

同様に、ヒト卵巣癌組織より、文献(J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, Molecular Cloning Second edition, Cold Spring harbor Laboratory Press, 1989)記載の方法によりmRNAを抽出した。さらに、オリゴdTセルロースでpolyA(+)RNAを精製した。

それぞれのpolyA(+)RNAよりオリゴキャップ法[M. Maruyama and S. Sugano, Gene, 138: 171-174 (1994)]によりcDNAライブラリーを作製した。Oligo-cap linker (配列番号: 3) 及びOligo dT primer (配列番号: 4) を用いて文献[鈴木・菅野, 蛋白質 核酸 酵素, 41: 197-201 (1996)、Y. Suzukiら, Gene, 200: 149-156 (1997)]に記載の方法に従ってBAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) 処理、TAP (Tobacco Acid Phosphatase) 処理、RNAライゲーション、第一鎖cDNAの合成とRNAの除去を行った。次いで、5'末端側のセンスプライマー (配列番号: 5) と3'末端側のアンチセンスプライマー (配列番号: 6) の2種のPCRプライマーを用いるPCR (polymerase chain reaction) により二本鎖cDNAに変換し、SfiIで切断した。なお、このPCRは市販のキット: GeneAmp XL PCRキット (Perkin Elmer社製) を使用して、95℃で5分間熱処理後、95℃で1分間、58℃で1分間及び72℃で10分間の反応サイクルを12回繰り返す、その後4℃で保持することにより行った。次いで、DraIIIで切断したベクターpME18SFL3 (GenBank AB009864、発現ベクター, 3392 bp) にcDNAの方向性を決めてクローニングし、cDNAライブラリーを作製した。これらより得たクローンのプラスミドDNAについて、cDNAの5'端と3'端の塩基配列を、DNAシーケンシング試薬 (Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit 又はBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, PE Biosystems社製) を用い、マニュアルに従ってシーケンシング反応を行った後、DNAシーケンサー (ABI PRISM 377, PE Biosystems社製) を用いて決定した。

〔参考例2〕VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する新規増殖因子の同定

作製したcDNAライブラリーの各クローンの塩基配列がコードし得る各フレームのアミノ酸配列について、蛋白質アミノ酸配列データベースSWISSPROTあるいは塩基配列データベースGenBankに登録されているVEGF/PDGFスーパーファミリーに属する既知蛋白質であるヒトVEGF (SWISSPROTアクセッションナンバー: P15692)、ヒトVEGF-B (SWISSPROTアクセッションナンバー: P49765)、ヒトVEGF

－C (SWISSPROTアクセッションナンバー：P 4 9 7 6 7)、ヒトVEGF－D (GenBankアクセッションナンバー：A J 0 0 0 1 8 5)、ヒトPIGF (SWISSPROTアクセッションナンバー：P 4 9 7 6 3)、ヒトPDGF－A (SWISSPROTアクセッションナンバー：P 0 4 0 8 5) 及びヒトPDGF－B (SWISSPROTアクセッションナンバー：P 0 1 1 2 7) の7分子のアミノ酸配列に対する相同性解析を行い、これら分子のアミノ酸配列と相同性をもつアミノ酸配列をコードするcDNAクローンを選択し、そのクローンにコードされる蛋白質をVPLFとした。配列番号1にVPLFのアミノ酸配列を、配列番号2にその塩基配列をそれぞれ示す。

VPLFは、BLAST2を用いた相同性解析において、血管内皮増殖因子ファミリーに属する蛋白質ヒトVEGF、ヒトVEGF－B、ヒトVEGF－C、ヒトVEGF－D及び血小板由来増殖因子ファミリーに属する蛋白質ヒトPDGF－A、ヒトPDGF－Bと、それぞれP値0. 0 0 2 2で29%、P値0. 0 0 1 4で29%、P値0. 0 0 0 2 2で25%、P値 $1. 8 \times 10^{-7}$ で29%、P値0. 0 0 1 6で36%、P値0. 0 0 0 5 9で28%の有意な相同性を示した。また、同じVEGF/PDGFスーパーファミリーに属するNZ2－VEGF (SWISSPROTアクセッションナンバー：P 5 2 5 8 4) 及びNZ7－VEGF (SWISSPROTアクセッションナンバー：P 5 2 5 8 5) とも、それぞれP値 $4. 7 \times 10^{-5}$ で29%、P値 $7. 7 \times 10^{-7}$ で30%と有意な相同性を示した。血管内皮増殖因子ファミリーに属する蛋白質ヒトPIGFとは、P値0. 9 4で26%の相同性を示した。VEGF/PDGFスーパーファミリーにおいては、ダイマー間のジスルフィド結合形成、蛋白質分子内のジスルフィド結合形成、及び、活性発現に重要な8個のシステイン残基が存在し (J. Biol. Chem., 269, 32879-32885, 1994)、これら8個のシステイン残基は、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子間で保存されていることが知られている。VPLFのアミノ酸配列をアライメントプログラムCLUSTAL W (Nucleic Acids Reserch, 22, 4673-4680, 1994) を用いて既知VEGF/PDGFスーパーファミリー分子と比較してみると、配列番号1で示されるアミノ酸配列においても該モチーフを形成するために必須なシステイン残基の位置と数

が完全に保存されていることが分かった（図1）。従って、VPLFがVEGF／PDGFスーパーファミリーに属する増殖因子としての活性を有することは明白である。なお、図1中のVEGF、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PDGF-A、PDGF-B、PIGF、NZ2およびNZ7は、それぞれヒトVEGF、ヒトVEGF-B、ヒトVEGF-C、ヒトVEGF-D、ヒトPDGF-A、ヒトPDGF-B、ヒトPIGF、NZ2-VEGFおよびNZ7-VEGFを指す。また、VPLFとファミリー分子間で保存されている配列を白抜きで示し、すべてのファミリー分子で保存されているシステイン残基に＊印を、その他のアミノ酸残基に#印を記した。

配列番号2に示した塩基配列をもとに、塩基配列データベースGenBank／EMBL／DDBJを、BLAST2を用いて検索したところ、同一遺伝子由来のESTと考えられる塩基配列3個と一致していることが分かった（1999年2月5日現在）。これらESTのGenBankアクセッションナンバーは、W21436、AI024617、AA759138であり、VPLF塩基配列との関係を図2に示す。これらEST塩基配列はVPLFの完全長をカバーしていない。それぞれのESTの塩基配列と相同性を示す遺伝子をGenBank、EMBL及びDDBJの各データベースよりBLAST2を用いて検索したが、有意な相同性を示す遺伝子はどのESTにおいても選択されなかった。従って、VPLFは本発明により初めて取得された新規な遺伝子であることが分かった。

VPLFをコードするcDNA（配列番号2の全塩基配列）を含有するプラスミドNT2RP4000328を含む大腸菌：Escherichia coli DH10B/NT2RP4000328及びその部分配列cDNA（配列番号2のうち、塩基第576番～第1328番）を含有するプラスミドOVARC1001401を含む大腸菌：Escherichia coli DH10B/OVARC1001401は、それぞれFERM BP-6686及びFERM BP-6687として、平成11年4月1日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6：郵便番号305-8566）に寄託されている。

〔参考例3〕VPLFの塩基配列の解析

配列番号2に示したVPLFの塩基配列をもとに、蛋白質の開始コドン予測プ

プログラムATGP r (Bioinformatics, 14, 384-390, 1998)を用いて開始コドン周辺配列を解析した。5'末端側から94～96番目に位置するATGが開始コドン、1129～1131番目に位置するTAGが終止コドンと特定され、ORFにコードされる蛋白質は345アミノ酸から構成されると推定された。さらに、配列番号1に示したVPLFのアミノ酸配列をもとに、蛋白質の細胞内局在性部位予測プログラムPSORT (Genomics, 14, 897-911, 1992)を用い、分泌蛋白質としての特徴を有するかどうかについて解析を行った。VPLFのN末端14残基のアミノ酸配列部分は、分泌蛋白質に見られるシグナルペプチド配列の特徴を有しており、VPLFは分泌蛋白質に分類された。また、GENETYX-MAC 7.3 (SOFTWARE DEVELOPMENT CO., LTD製)を用いて疎水性プロットを作製した結果を図3に示す。VPLFのN末端部分には分泌蛋白質に特徴的な疎水性の高い領域が存在する。

〔参考例4〕 VPLFを発現している臓器

VPLFの塩基配列の一部と一致した3個のEST、W21436、AI024617、AA759138は、それぞれ肺、精巣、精巣から単離された。また、VPLFをコードするcDNAクローンの3'末端非翻訳領域の塩基配列をもとに、塩基配列データベースGenBank、EMBL、DDBJをBLAST2を用いて検索したところ、同一遺伝子由来のESTと考えられる塩基配列16個と一致していることが分かった(1999年2月5日現在)。これらESTのGenBankアクセッションナンバーは、AA631149、AA039965、AA039880、AI128937、N89807、AA613059、AA868252、C02066、AI051824、AA594888、N66753、AI193332、AI243165、AI262908、AI284795及びN22076であり、UniGene Hs. 43080として登録されている。これら16個のESTは、大腸、耳、肺、腎臓、卵巣、甲状腺上皮、前立腺、子宮から単離された。従って、VPLFが大腸、耳、肺、腎臓、卵巣、甲状腺上皮、前立腺、精巣、子宮で発現していることが示された。

〔参考例5〕 RT-PCR法を用いたVPLFをコードするDNAの発現解析

Clontech社より購入したヒト臓器polyA⁺RNA 4 μ g、および癌細胞株からA

G P C 法 [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、実験医学、9, 1937 (1991)] にて調製した全RNA 4 μ g を鋳型とし、市販のSUPER SCRIPT Preamplification System for first strand cDNA Synthesis (GIBCO BRL社製) を用い、添付マニュアルに従ってcDNAを合成した。

ヒト臓器polyA⁺RNAとしては、副腎、脳、小脳、脳下垂体、腎臓、膵臓、小腸、骨髄、心臓、肝臓、肺、リンパ節、乳腺、胎盤、前立腺、唾液腺、骨格筋、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、子宮由来のpolyA⁺RNAを用いた(図4において、それぞれ1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25と略した)。

癌細胞株としては、T細胞株(Jurkat、Molt-3、Molt-4、HUT78; 図5において、それぞれ1、2、3、4と略した)、B細胞株(Namalwa KJM-1、Daudi、Raji; 図5において、それぞれ5、6、7と略した)、顆粒球/単球系細胞株(HL-60、U-937、THP-1; 図5において、それぞれ8、9、10と略した)、血管内皮細胞株(IVEC、HUVEC; 図5において、それぞれ11、12と略した)、メラノーマ細胞株(WM266-4、WM115; 図5において、それぞれ13、14と略した)、神経芽細胞腫細胞株(SK-N-MC; 図5において15と略した)、肺癌細胞株(PC-9、HLC-1、QG90; 図5において、それぞれ16、17、18と略した)、前立腺癌細胞株(PC-3; 図5において19と略した)、胃癌細胞株(KATOIII; 図5において20と略した)、膵臓癌細胞株(Capan-1、Capan-2; 図5において、それぞれ21、22と略した)、大腸癌細胞株(Colo205、SW1116、LS180; 図5において、それぞれ23、24、25と略した)を用いた。Jurkat、QG90およびSW1116は愛知癌センターより入手した。HLC-1は大阪大学癌研究所より入手した。KATO IIIおよびPC-9は免疫生物研究所より入手した。HUVEC (human umbelical vascular endothelial cell) はクラボウ社より入手した。IVEC [J. Cell. Physiol., 157, 41 (1993)] はN. T. L. FRANCE社より入手した。Molt-4、DaudiはJapanese Collection of Research Bioresources (J C R B) cell bank [インターネットアドレス<http://cellbank.nihs.go.jp/>] より入手した。それ以外の細胞は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collectio

n) より入手した。

次いで、合成した cDNA を鋳型として PCR を行った。すなわち、下記に示すヒト VPLF、ヒト VEGF、ヒト VEGF-B、ヒト VEGF-C、ヒト VEGF-D、ヒト PDGF-A、ヒト PDGF-B、ヒト PIGF、あるいはヒト β アクチンに特異的な塩基配列を含むプライマーを用い、合成した cDNA を滅菌水を用いて 50 倍に希釈した溶液を材料にして常法により反応液 [10mmol/l Tris-HCl (pH8.3), 50mmol/l KCl, 1.5mmol/l $MgCl_2$, 0.2mmol/l dNTP, 0.001% (w/v) gelatin, 0.2 μ mol/l 遺伝子特異的プライマー, 1 unit recombinant Taq polymerase (Takara 社製)] を調製後、94℃で3分間反応させ、次いで94℃で30秒間、65℃で1分間、72℃で2分間のサイクルを30あるいは35サイクル反復し、最後に72℃で7分間反応させ、4℃で一晩保存する条件でPCRを行った。

該PCRでは、配列番号7及び配列番号8に示したオリゴヌクレオチドをヒト VPLF に特異的なプライマーとして、配列番号9及び配列番号10に示したオリゴヌクレオチドをヒト VEGF に特異的なプライマーとして、配列番号11及び配列番号12に示したオリゴヌクレオチドをヒト VEGF-B に特異的なプライマーとして、配列番号13及び配列番号14に示したオリゴヌクレオチドをヒト VEGF-C に特異的なプライマーとして、配列番号15及び配列番号16に示したオリゴヌクレオチドをヒト VEGF-D に特異的なプライマーとして、配列番号17及び配列番号18に示したオリゴヌクレオチドをヒト PIGF に特異的なプライマーとして、配列番号19及び配列番号20に示したオリゴヌクレオチドをヒト PDGF-A に特異的なプライマーとして、配列番号21及び配列番号22に示したオリゴヌクレオチドをヒト PDGF-B に特異的なプライマーとして、配列番号23及び配列番号24に示したオリゴヌクレオチドをヒト β アクチンに特異的なプライマーとして用いた。

該PCR反応液をアガロースゲル電気泳動により分析したところ、それぞれのプライマーに特異的なDNAのバンドが観察され、その大きさは、ヒト VPLF、ヒト VEGF、ヒト VEGF-B、ヒト VEGF-C、ヒト VEGF-D、ヒト PDGF-A、ヒト PDGF-B、ヒト PIGF、ヒト β アクチンでそれぞれ、

約1,000bp、350bp、300bp、520bp、500bp、420bp、430bp、360bp、800bpであった。

これらのバンドの濃さを比較することで、各種因子の発現量の半定量的な比較を行った。ヒト臓器より調製したcDNAを材料にした場合の結果を図4に、癌細胞株から調製したcDNAを材料にした場合の結果を図5に示した。図4及び図5により、VPLFは、正常組織よりも癌化した細胞での発現が高いこと、癌細胞株の中でも上皮系の細胞で強く発現し、血球系での発現は低いことが分かった。

〔参考例6〕 昆虫細胞を宿主とした、全長型VPLF及びVPLFΔN（配列番号1の1～226番目のアミノ酸が欠失したN末欠失体）の発現

昆虫細胞による組換え蛋白質の生産には目的DNAを組み込んだ組換えウイルスの作製が必要であるが、その作製には、(1) 目的の蛋白質をコードするcDNAを含む特殊なベクター（トランスファーベクター）を作製する過程、(2) バキュロウイルスDNAとトランスファーベクターとを昆虫細胞にコトランスフェクションし、相同組換えにより組換えウイルスを作製し、さらに増殖させる過程、及び(3) 組換えウイルスを細胞に感染させ、目的の蛋白質を発現させる過程が含まれる。具体的には、以下のようにして組換えウイルスを作製し、目的蛋白質を生産した。

(1) トランスファーベクターの作製

(i) pVL-VPLF : VPLFの全長（配列番号1の1～345番目のアミノ酸配列）をコードするDNAを運ぶベクター、pVL-VPLFを以下のように作製した（図6）。

参考例2に記載のプラスミドNT2RP4000328（以下「pME-VPLF」という）のSacI-BglII断片（0.66 kb）をベクターpET21a（+）（ノバジェン社製）のSacI-BglII部位へ挿入することにより、プラスミドpET21-VPLF（5'）を作製した。本プラスミドをNotI-BglIIで切断し、0.68 kbの断片（断片A）を調製した。

pME-VPLFを鋳型とし、配列番号25及び配列番号26に示したDNAをプライマーとして用いてPCRを行った。増幅したDNA断片をBglII及びEco

RIで切断し、0.4 kbの断片（断片B）を調製した。

断片A及び断片Bを、昆虫細胞トランスファーベクター pVL1392（ファーミンジェン社製）のNotI-EcoRI部位に挿入し、pVL-VPLFを作製した。本プラスミドには、VPLFの第1番目のMetから第345番目のGlyまでをコードするDNAが含まれていた。

(ii) pVL-VPLF Δ N : VPLFの、C末端側の部分ペプチド（配列番号1の227～345番目のアミノ酸配列）をコードするDNAを含むベクター、pVL-VPLF Δ Nを以下のように作製した（図7）。

昆虫由来の分泌蛋白質メリチンのシグナルペプチドDNAを運ぶプラスミド pMbac（ストラタジーン社製）をNheIで切断した後、クレノウフラグメント（Klenow Fragment）で処理し、NotIリンカー（5'-GCGGCCGC-3'）を連結させてプラスミド pMbac (NotI) を作製した。本プラスミドをNotI及びSmaIで切断し、85 bpの断片を調製した（断片C）。

pME-VPLFを鋳型とし、配列番号26及び配列番号27に示したDNAをプライマーとして用いてPCRを行った。増幅した断片をSspI及びEcoRIで切断し、0.36 kbの断片を調製した（断片D）。

断片C及び断片Dを、ベクター pVL1392のNotI-EcoRI部位に挿入し、pVL-VPLF Δ Nを作製した。本プラスミドには、メリチン由来のシグナルペプチド、メリチン由来のペプチド（Asp-Pro-Ser-Pro：配列番号34）、及びVPLFの227番目のPheから345番目のGlyまでをコードするDNAが含まれていた。

（2）組換えウイルスの作製

ESF921培地（プロテインエクспレッション社製）にて培養した昆虫細胞 Sf9（岩城硝子社製）に、線状バキュロウイルスDNA〔バキュロゴールド・バキュロウイルスDNA；ファーミンジェン社製〕及び上記（1）で作製したトランスファーベクターをリポフェクション法〔蛋白質核酸酵素、37、2701(1992)〕にて導入することによって、組換えバキュロウイルスを作製した。これは、具体的には以下のようにして行った。

4 μ gのpVL-VPLF又はpVL-VPLF Δ Nと、15 ngの線状バ

キユロウイルスDNAとを12mlの滅菌蒸留水に溶解し、さらに、リポフェクチン6mlと滅菌蒸留水6mlとを混和したものを添加し、室温で15分間放置した。一方、Sf9細胞 1×10^6 個を2mlのESF921培地に懸濁し、直径50mmの細胞培養用プラスチックシャーレに入れた。ここに、上記のプラスミドDNA、線状バキユロウイルスDNA、及びリポフェクチン混和溶液全量を加え、27℃で3日間培養後、組換えウイルスを含む培養上清1mlを採取した。シャーレには新たにESF921培地1mlを添加し、さらに27℃で3日間培養して、組換えウイルスを含む培養上清をさらに1.5ml取得した。

次に、VPLFをコードするDNAまたはVPLFΔNをコードするDNAを含む組換えウイルスをそれぞれ、以下の手順で増殖させた。

Sf9細胞を 5×10^5 /mlとなるように50mlのESF921培地中で、125ml容三角フラスコを用い、27℃にて125rpmで振とう培養した。細胞が 2×10^6 /mlにまで増殖した時点で、組換えウイルスをMOI（感染多重度）=10となるように感染させ、さらに3日間培養した。培養液を 11760 m/s^2 で10分間遠心分離して細胞を除去し、蛋白質発現に使用する組換えウイルス溶液を得た。

なお、組換えウイルス溶液の力価は以下に示す方法で測定した。

Sf9細胞 6×10^5 個を4mlのESF921培地に懸濁し、直径50mmの細胞培養用プラスチックシャーレに入れ、室温で1時間放置して細胞をシャーレに付着させた。上清を除き、ESF921培地400mlとESF921培地で希釈した上記組換えウイルス溶液100mlを加え、室温で1時間放置した後、培地を除き、5mlの1%低融点アガロース〔アガーブランク・アガロース；ファーマンジェン社製〕を含む培地〔滅菌した、1mlの5%アガーブランクプラス・アガロース水溶液と4mlのTMN-FHインセクトメディウム（ファーマンジェン社製）を混和し、42℃に保温したもの〕を該シャーレに流し込んだ。室温で15分間放置した後、乾燥を防ぐためにビニルテープをシャーレに巻き、密閉可能なプラスチック製容器に該シャーレを入れ、27℃で5日間培養した。該シャーレに0.01%のニュートラルレッドを含むPBSを1ml加え、さらに1日間培養した後、出現したプラーク数を数えた。その結果、 $0.5 \sim 2 \times 10^8$

／m l の組換えウイルス溶液を調製することができた。

(3) 蛋白質の発現

H i g h 5 細胞（インビトロジェン社製）を 5×10^5 ／m l となるように 100 m l の E S F 9 2 1 培地中で、250 m l 容三角フラスコを用い、27℃にて125 r p m で振とう培養した。細胞が $3 \sim 4 \times 10^6$ ／m l にまで増殖した時点で、 3×10^7 個になるように、25 m l の E S F 9 2 1 培地をあらかじめ添加してある底面積182 cm²のフラスコに継代した。室温で1時間放置して細胞を付着させた後、培地を除去し、V P L F をコードするDNA又はV P L F Δ N をコードするDNAを含む組換えウイルスを M O I = 5 になるように添加し、さらに E S F 9 2 1 培地を添加して10 m l とし、室温で1時間感染させた。E S F 9 2 1 培地を20 m l 添加し、27℃で3日間培養し、目的の組換え蛋白質を発現させた。

V P L F をコードするDNAまたはV P L F Δ N をコードするDNAを含む組換えウイルスを感染させた細胞の培養上清それぞれに、ヘパリンセルロファイン樹脂を添加して4℃にて一晚反応させた後、樹脂を回収して20 m m o l／l リン酸ナトリウム (pH 7.2) で洗浄し、1 m o l／l N a C l を含む同緩衝液で溶出させた。培養上清1 m l 相当分の溶出液を試料として、参考例13で得られた抗V P L F ペプチド抗体 (K M 2 6 7 6) を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、V P L F をコードするDNAを感染させた場合には分子量約40 k D a 付近のバンドが、V P L F Δ N をコードするDNAを含む組換えウイルスを感染させた場合には分子量約20 k D a 付近のバンドが検出された。

〔参考例7〕 V P L F Δ N の精製

V P L F Δ N を発現させたH i g h 5 細胞の培養上清400 m l に、50 m m o l／l リン酸ナトリウム (pH 7.2) で平衡化したヘパリンセルロファイン樹脂（チッソ社製）を4 m l 添加し、4℃で12時間静かに攪拌することによって、蛋白質を樹脂に吸着させた。樹脂をカラムに詰め、50 m m o l／l リン酸ナトリウム (pH 7.2) 10 m l で洗浄した後、50 m m o l／l リン酸ナトリウム (pH 7.2)／0.75 m o l／l N a C l 溶液10 m l で溶出した。20 m m o l／l リン酸ナトリウム (pH 7.2)／0.2 m o l／l N a C l 溶液に対し

て透析した後、 78400 m/s^2 で5分間遠心分離し、上清を、 20 mmol/l リン酸ナトリウム (pH 7.2) / 0.2 mol/l NaCl 溶液で平衡化した、 10 ml のSPセファロース (ファルマシアバイオテク社製) カラムに通塔した。 20 mmol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) / 0.2 mol/l NaCl 溶液 40 ml で洗浄した後、 $0.2\sim 1\text{ mol/l}$ NaCl のリニアグラジエント 40 ml で溶出させた。さらに、 20 mmol/l リン酸ナトリウム (pH 7.2) / 1 mol/l NaCl 溶液 10 ml で溶出させた。溶出条件は、 1 ml/分 、 2 ml/画分 で行った。VPLFΔNが多く含まれる画分を回収し、 3 mol/l NaCl になるように 20 mmol/l リン酸ナトリウム (pH 7.2) / 4 mol/l NaCl 溶液を添加した。次に、 20 mmol/l リン酸ナトリウム (pH 7.2) / 3 mol/l NaCl 溶液で平衡化したブチルセファロース (ファルマシアバイオテク社製) カラム 1.57 ml に通塔し、 20 mmol/l リン酸ナトリウム (pH 7.2) / 3 mol/l NaCl 溶液 10 ml で洗浄した後、 $3\sim 0\text{ mol/l}$ NaCl のリニアグラジエント 20 ml で溶出させた。溶出条件は、 0.2 ml/分 、 1 ml/画分 で行った。VPLFΔNを含む画分を回収し、セントリコン-10 (アミコン社製) を用いて濃縮した。

得られた濃縮液を試料として、 $5\sim 20\%$ ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、クマシーブリリアントブルーR250を用いたゲル染色によって解析した結果、精製純度は約85%であった。精製蛋白質のN末端アミノ酸配列を解析した結果、Asp-Pro-Ser-Pro-Phe-Val (配列番号35) 及びSer-Pro-Phe-Val-Phe-Gly (配列番号36) であったので、本精製蛋白質は、VPLFの227番目のPheから345番目のGlyのN末端に、メリチン成熟体由来の4アミノ酸 (Asp-Pro-Ser-Pro: 配列番号34) が付加した蛋白質 (配列番号32) と2アミノ酸 (Ser-Pro) が付加した蛋白質 (配列番号33) の混合物であることが明らかとなった。

次に、精製したVPLFΔN $2\text{ }\mu\text{g}$ を試料とし、還元条件下及び非還元条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、VPLFΔNの移動度の変化を調べた。検出は、クマシーブリリアントブルーR250での染色によって行った。その結果、還元条件下では分子量約20 kDaに相当する移動度を示し

ていたバンドが、非還元条件下では、移動度が低下し、分子量約30 kDaに相当する位置にバンドが検出された（図8）。したがって、VPLF Δ NはS-S結合を介した二量体を形成していることが示唆された。

次にN型糖鎖の有無を調べた。0.5% SDS及び50 mmol/l β -メルカプトエタノールの存在下で、2 μ gのVPLF Δ Nを100℃で5分間処理した後、2.5%になるようにNonidet P-40（ナカライテスク社製）を添加し、0.3 UのN-glycosidase F（宝酒造社製）を添加して反応させた。37℃で20時間反応させた後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、銀染色でVPLF Δ Nを検出した。その結果、N-glycosidase Fによる処理で分子量が低下したことから、VPLF Δ NにはN型糖鎖が付加されていることが示された。

〔参考例8〕動物細胞を宿主としたVPLFの発現

（1）組換えベクターの作製：

(i) pIRES-VPLF：pIRESneo（クロンテック社製）のNotI-EcoRI部位に、pVL-VPLFのNotI-EcoRI（1 kb）断片を挿入し、pIRES-VPLFを作製した（図9）。

(ii) pAGE248-VPLF及びpAGE210-VPLF：pVL-VPLFのNotI-EcoRI（1 kb）断片を、ベクターpBluescriptIIのNotI-EcoRIに挿入し、pBS-VPLFを作製した。pBS-VPLFをNotIで切断し、Klenowで処理した後、BamHIリンカー（5'-CGGATCCG-3'）を挿入し、pBS-VPLF(B)を作製した。pBS-VPLF(B)のBamHI-KpnI（1 kb）をpAGE210又はpAGE248 [Sasaki, K. ら、J. Biol. Chem., 269, 14730-14737 (1994)] のBamHI-KpnI部位に挿入し、pAGE210-VPLF及びpAGE248-VPLFを作製した（図10）。

（2）細胞への組換えベクターの導入

(i) PC-9細胞への導入：

プラスミドpIRES-VPLF 1 μ gを含むRPMI 1640培地（0.2%炭酸ナトリウム、2 mmol/l L-グルタミンを含む）50 mlと、2 mlのLipofectAMINETM 2000（GIBCO BRL社製）を含むRPMI 1640

0 培地 50 ml とを混合し、室温で 20 分間放置した。PC-9 細胞を RPMI 1640 培地に懸濁し、24 ウェルプレートに添加した 0.5 ml の RPMI 1640 培地中へ、 3×10^5 個の細胞を播種した。本細胞培養液へ上記の混合液を添加し、37℃で一日培養した。0.3 mg/ml の G418 及び 5% dFCS (ギブコ社製) を含む RPMI 1640 培地で培養し、耐性株 (以下「PC-9/VPLF 株」という) を取得した。

(ii) CHO (DG44 株) 細胞への導入:

8×10^6 細胞/ml になるように K-PBS 溶液 (10.2 g KCl, 0.16 g NaCl, 1.15 g Na_2HPO_4 , 0.2 g KH_2PO_4 , 0.81 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) に懸濁した細胞懸濁液 200 ml に、pAGE248-VPLF 又は pAGE210-VPLF を 4 μ g 添加し、Gene-Pulser 2 (BioRad 社製) を用いて、エレクトロポレーション法 (0.35 kV, 250 μ F) にて組換えベクターを細胞に導入した。組換えベクターを導入した細胞を 5% の dFCS (GIBCO 社製) を含む EXCELL 302 培地 (ニチレイ社製) で 1 日間培養後、0.3 mg/ml になるようにハイグロマイシンを添加し耐性株を選択した。さらに、100 nmol/l 或いは 500 nmol/l になるようにメトトレキサート (MTX) を添加し耐性株を選択した (以下、pAGE248-VPLF、pAGE210-VPLF を導入して作製した耐性株を、それぞれ「DG44/pAGE248-VPLF 株」、「DG44/pAGE210-VPLF 株」といい、2 種類の株を「DG44/VPLF 株」と総称する)。

(3) 発現の確認

上記 (2) (i) で作製した PC-9/VPLF 株、及び (ii) で作製した DG44/VPLF 株を、それぞれ RPMI 1640 培地 (0.2% 炭酸ナトリウム、2 mmol/l L-グルタミン、10% FCS 及び 0.3 mg/ml G418 を含む) 及び、EXCELL 302 (5% FCS、0.3 mg/ml ハイグロマイシン、及び 100 nmol/l 若しくは 500 nmol/l MTX を含む) 中で、コンフルエントになるまで培養し、培養上清を得た。この培養上清に、それぞれ、ヘパリンセルロファイン樹脂 (チッソ社製) を添加して 4℃ にて一晩反応させた後、樹脂を回収して 20 mmol/l リン酸ナトリウム (pH 7.2) で洗浄し、1 mmol/l NaCl を含む同緩衝液

で溶出させた。培養上清 1 m l 相当分の溶出液を試料として、下記の参考例 1 3 で取得される抗 V P L F ペプチド抗体 (K M 2 6 7 6) を用いてウェスタンブロットティングを行った。その結果を図 1 1 に示した。図 1 1 において、P C - 9 / V P L F 株の培養上清から調製した溶出液を泳動したレーンを C M V - V P L F、D G 4 4 / p A G E 2 4 8 - V P L F 株の培養上清から調製した溶出液を泳動したレーンを S V 4 0 - V P L F、D G 4 4 / p A G E 2 1 0 - V P L F 株の培養上清から調製した溶出液を泳動したレーンを M o - V P L F として示した。

ウェスタンブロットティングによる解析の結果、動物細胞で発現させた培養上清中から、分子量約 4 5 k D a 及び約 2 0 k D a の 2 本のバンドが検出された。約 2 0 k D a のバンドは、昆虫細胞を宿主として発現させた V P L F Δ N とほぼ同じ移動度を示した。したがって、V P L F は動物細胞においてプロセッシングを受けたフォームで発現することが分かった。

〔参考例 9〕 V P L F のヒト未分化造血細胞に及ぼす効果

参考例 7 で得られた V P L F Δ N のヒト未分化造血細胞に及ぼす効果を以下のようにして調べた。ヒト未分化造血細胞として、C D 3 4 陽性ヒト骨髓細胞 (B I O W H I T T A K E R 社製) を用いた。I M D M 培地 (S T E M C E L L T E C H N O L O G I E S 社製) 中に 1×10^5 個 / m l の細胞密度で懸濁した C D 3 4 陽性ヒト骨髓細胞を 100μ l / ウェルで細胞培養用 9 6 ウェルプレート (住友ベークライト社製) に播種し、終濃度 500 ng / ml になるように V P L F Δ N 又は幹細胞因子 S C F (G e n z y m e 社製) を加え、5 % C O ₂ 条件下、3 7 ° C で 4 8 時間培養した。4 8 時間後、 $9.25 \text{ kBq [6-}^3\text{H]} - \text{t h y m i d i n e}$ (以下「³H-T d R」と略す) (N E N 社製) を加え更に 1 2 時間培養し、セルハーベスターを用いてガラスフィルター上に細胞を回収した。回収した細胞内に取り込まれた放射活性を放射線カウンターマトリックス 9 6 (パッカー社製) を用いて測定した。ボランティア二人の C D 3 4 陽性ヒト骨髓細胞ロット番号 9 F 0 3 2 9 (1 9 歳、アジア人、男性、C D 3 4 陽性率 96.4%) とロット番号 9 F 1 8 0 9 (2 9 歳、白人、男性、C D 3 4 陽性率 96.1%) を用い、独立に上述の実験を繰り返したが、いずれの場合も同じ結果が得られた。ロット番号 9 F 0 3 2 9 を用いた実験の結果を図 1 2 に示した。S C F のヒト C D 3 4 陽性骨髓細胞に対する増殖促進活性は観

察されたが、V P L F Δ Nの効果としては当該増殖促進活性は観察されなかった。

〔参考例 1 0〕 V P L F の平滑筋細胞に及ぼす効果

参考例 7 で得られた V P L F Δ N の平滑筋細胞に対する生物活性を、以下のようにして確認した。

9 6 ウェルコラーゲンコートプレート (IWAKI社製) に、1 0 %牛胎児血清 (FBS)、ペニシリン (GIBCO BRL社製) 1 0 0 u n i t / m l、ストレプトマイシン (GIBCO BRL社製) 1 0 0 μ g / m l を添加した M - 1 9 9 培地 (GIBCO BRL社製) に浮遊させたラット由来平滑筋細胞 (RSMC) [FEBS Letters, 425, 123, (1998)] を 3 0 0 0 個 / 2 0 0 μ l / ウェルとなるように加え、3 7 $^{\circ}$ C の C O ₂ インキュベーター中で 1 日間培養した。培養後、培養上清を除去し、各ウェルに 1 0 0 μ l ずつ O p t i - M E M 培地 (GIBCO BRL社製) を加え、3 7 $^{\circ}$ C で 3 時間培養した。培養後、各ウェルに O p t i - M E M 培地で希釈したヒト V E G F 1 6 5 (R&D社製)、ヒト I L - 5 (R&D社製)、ヒト P D G F B B (R&D社製) 又は V P L F Δ N をそれぞれ 1 0 0 μ l / ウェル (終濃度 160pg/ml から 500ng/ml) 添加し、3 7 $^{\circ}$ C の C O ₂ インキュベーター中で 2 日間培養した。培養終了後、各ウェルに 1 0 μ l ずつ M T T 反応試薬 [Cell Peoliferation Kit I ; ベーリンガーマンハイム社製] を添加し、3 7 $^{\circ}$ C の C O ₂ インキュベーター中で 4 時間培養した。培養終了後、各ウェルに 1 0 0 μ l ずつ溶解試薬を加えた後、3 7 $^{\circ}$ C でインキュベーター中で一晩溶解した。溶解終了後、O D 6 5 0 n m を対象波長として O D 5 9 0 n m における各ウェルの吸光値を測定した。

結果を図 1 3 に示す。ヒト V P L F Δ N は濃度依存的に、R S M C に対する増殖促進活性を示した。陽性コントロールのヒト P D G F B B の増殖活性は 5 0 ~ 1 0 0 倍低い濃度で R S M C に対する増殖促進活性を示した。これに対してヒト V E G F 1 6 5 およびコントロールとして用いたヒト I L - 5 は R S M C に対する増殖活性を示さなかった。

〔参考例 1 1〕 V P L F の内皮細胞に及ぼす効果

参考例 7 で得られた V P L F Δ N の内皮細胞に対する生物活性を、以下のようにして確認した。

9 6 ウェルコラーゲンコートマイクロタイタープレート (IWAKI社製) に、E

ーBM培地に2%牛胎児血清(FBS)、ヒト組換え型上皮成長因子(rEGF) 10 ng/ml、ハイドロコチゾン1 μ g/ml、ゲンタマイシン50 μ g/ml、アンファテリシンB 50 ng/mlを添加した培地(クラボウ社製)に浮遊させたヒト皮膚由来微小血管内皮細胞HMVEC(クラボウ社製)を3000個/100 μ l/ウェルになるように加えた。次に、上記培地で希釈したヒトVEGF 165(R&D社製)、ヒトIL-5(R&D社製)、ヒトPDGF BB(R&D社製)又はVPLF Δ Nをそれぞれ100 μ l/ウェル(終濃度10pg/mlから100ng/ml)添加し、37℃のCO₂インキュベーター中で5日間培養した。培養終了後、各ウェルに20 μ lの細胞発色用試薬[Cell Counting Kit; 同仁化学社製]を加え、37℃で1~2時間培養した。培養終了後、OD450nmを対象波長としてOD650nmにおける各ウェルの吸光値を測定した。

結果を図14に示す。ヒトVEGF 165は濃度依存的にHMVECに対する増殖活性を示したが、ヒトVPLF Δ N、ヒトPDGF BBは増殖活性を示さなかった。また、コントロールとして使用したヒトIL-5は増殖活性を示さなかった。

[参考例12] VPLF抗体作製用の抗原の調製

VPLFの蛋白配列を解析し、親水性の高い部分、N末端、C末端、二次構造上ターン構造、ランダムコイル構造を有する部分の中から、抗原として適当と考えられる部分配列として、化合物1~4(配列番号28~31)を選択した。

以下の参考例において、化合物の理化学的性質は次の方法により測定した。質量分析は、日本電子JMS-HX110Aを用いるFAB-MS法により行った。アミノ酸分析は、コーエン(Cohen, S. A.)らの方法[アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 222, 19 (1994)]により行った。加水分解は塩酸蒸気中110℃で20時間行い、加水分解物のアミノ酸組成はウォータース・アキュ・タグ(Waters AccQ-Tag)アミノ酸分析計(Waters社製)を用いて分析した。

(1) 化合物1(配列番号28)(H-Cys-Thr-Gln-Ala-Glu-Ser-Asn-Leu-Ser-Ser-Lys-Phe-Gln-Phe-Ser-Ser-Asn-Lys-Glu-Gln-Asn-Gly-NH₂)の合成

16. 5 μ molのFmoc-NHが結合した担体樹脂[Rink amide MBHA resin樹

脂；ノババイオケム社製] 30 mgを自動合成機（島津製作所製）の反応容器に入れ、858 μ lのDMFを加えて1分間攪拌して溶液を排出した後、島津製作所の合成プログラムに従って次の操作を行った。

（a）30%ピペリジン-DMF溶液734 μ lを加えて混合物を4分間攪拌し、該溶液を排出し、この操作をもう1回繰り返した。

（b）担体樹脂を500 μ lのDMFで1分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を5回繰り返した。

（c）Fmoc-Gly-OH（165 μ mol）、HBTU（165 μ mol）、HOBt 1水和物（165 μ mol）およびDIEA（330 μ mol）をDMF（858 μ l）中で3分間攪拌し、得られた溶液を樹脂に加えて混合物を30分間攪拌し、溶液を排出した。

（d）担体樹脂を858 μ lのDMFで1分間洗浄後、溶液を排出し、これを5回繰り返した。

こうして、Fmoc-Gly-NHが担体上に合成された。

次に、（a）及び（b）の工程の後、（c）の工程でFmoc-Asn(Trt)-OHを用いて縮合反応を行い、（d）の洗浄工程を経て、Fmoc-Asn(Trt)-Gly-NHが担体上に合成された。

以下、工程（c）において、Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OHを順次用いて、（a）～（d）の工程を繰り返した。その後、（a）及び（b）の脱保護、洗浄工程を経て、メタノール、ブチルエーテルで順次洗浄し、減圧下で12時間乾燥して、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。ただし、Fmoc-Phe-OHの縮合時には、858 μ LのDMFの代わりに198 μ LのNMPと660 μ LのDMFの混合溶媒を用いた。これに、TFA（90%）、チオアニソール（5%）、および1,2-エタンジチオール（5%）からなる混合溶液1 mlを加えて室温で2時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。樹脂を濾別後、得られた溶液にエーテル約10 mlを加え、生成し

た沈澱を遠心分離およびデカンテーションにより回収し、粗ペプチドとして 37.9 mg を取得した。この粗生成物を、1 ml の 90% 酢酸、4 ml の DMF、1 ml のトリフルオロエタノールに溶解した上清を逆相カラム（資生堂製、CAPCELL PAK C18 30mm I.D. X 25mm）を用いた HPLC で精製した。0.1% TFA 水溶液に、TFA 0.1% を含む 90% アセトニトリル水溶液を加えていく直線濃度勾配法で溶出し、220 nm で検出し、化合物 1 を含む画分を得た。さらに粗ペプチド溶解時の沈澱に 30 mg のジチオスレイトールと 1 ml の 8 mol/l 尿素を加えて溶解し、3 ml の 2 mol/l 酢酸で希釈して、上記と同様に逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 1 を含む画分を得た。これらの画分を凍結乾燥して、化合物 1 を 8.6 mg 得た。

質量分析 [FABMS]: $m/z = 2434.0 (M+H^+)$;

アミノ酸分析: Asx3.1(3), Ser4.6(5), Glx5.1(5), Gly1.1(1), Thr0.9(1), Ala1.0(1), Cys1.3(1), Lys2.0(2), Leu1.0(1), Phe2.0(2)

(2) 化合物 2 (配列番号 29) (H-Cys-Ser-Ile-Arg-Glu-Glu-Leu-Lys-Arg-Thr-Asp-Thr-Ile-Phe-Trp-Pro-Gly-NH₂) の合成

16.5 μmol の Fmoc-NH が結合した担体樹脂 [Rink Amide MBHA 樹脂、ノババイオケム社製] 30 mg を出発物質として、上記 (1) と同様にして、Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Cys(Trt)-OH を順次縮合した後に、Fmoc 基除去、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これに 5 mg/mL の濃度で 2-メチルインドールを含む TFA (82.5%)、チオアニソール (5%)、水 (5%)、エチルメチルスルフィド (3%)、1,2-エタンジチオール (2.5%) およびチオフェノール (2%) からなる混合溶液 1 ml を加えて室温で 6 時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。上記 (1) と同様にして、粗ペプチド 41.4 mg を取得し、酢酸水溶液に溶解後、逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 2 を 7.1 mg 得た。

質量分析 [FABMS]: $m/z = 2051.2 (M+H^+)$;

アミノ酸分析：Asx1.1(1), Ser1.0(1), Glx2.1(2), Gly1.3(1), Arg1.5(2), Thr1.9(2), Pro1.1(1), Cys1.2(1), Lys1.0(1), Ile1.8(2), Leu1.1(1), Phe0.9(1) (Trpは分析せず)

(3) 化合物3 (配列番号30) (Ac-Thr-Phe-Asp-Glu-Arg-Phe-Gly-Leu-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp-Asp-Ile-Cys-Lys-NH₂) の合成

16.5 μ mol のFmoc-NHが結合した担体樹脂 [Rink Amide MBHA樹脂、ノババイオケム社製] 30mgを出発物質として、上記(1)と同様にして、Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OHを順次縮合した後に、Fmoc基除去し、31 μ lの無水酢酸を含む500 μ lのDMFを加えて30分間攪拌した。溶液を排出後、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これにTFA (82.5%)、チオアニソール (5%)、水 (5%)、エチルメチルスルフィド (3%)、1,2-エタンジチオール (2.5%) およびチオフェノール (2%) からなる混合溶液1mlを加えて室温で8時間放置し、側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行った。上記(1)と同様にして粗ペプチド40.7mgを取得し、酢酸水溶液に溶解後、逆相カラムを用いたHPLCで精製し、化合物3を18.3mg得た。

質量分析 [FABMS]: $m/z = 2071.6$ (M+H⁺) ;

アミノ酸分析：Asx4.0(4), Glx3.1(3), Gly1.0(1), Arg0.9(1), Thr1.0(1), Pro1.0(1), Cys1.3(1), Lys1.0(1), Ile0.9(1), Leu1.0(1), Phe2.0(2)

(4) 化合物4 (配列番号31) (H-Cys-Arg-Gly-Ser-Thr-Gly-Gly-OH) の合成

24.0 μ mol のFmoc-Glyが結合した担体樹脂 [Wang樹脂、ノババイオケム社製] 30mgを出発物質として、上記(1)と同様にして、Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OHを順次縮合した後に、Fmoc基除去し、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これにTFA (82.5%)、チオアニソール (5%)、水 (5%)、エチルメチルスルフィド (3%)、1,2-エタンジチオール (2.5%) およ

びチオフェノール (2%) からなる混合溶液 1 m l を加えて室温で 8 時間放置し、側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行った。上記 (1) と同様にして粗ペプチド 21.1 mg を取得し、0.1 % T F A 水溶液に溶解後、逆相カラムを用いた H P L C で精製し、化合物 4 を 3.6 m g 得た。

質量分析 [FABMS] : $m/z = 637.2$ ($M+H^+$) ;

アミノ酸分析 : Ser 0.9 (1), Gly 3.1 (3), Arg 0.9 (1), Thr 0.9 (1), Cys 1.1 (1)

〔参考例 13〕 V P L F を認識するモノクローナル抗体の作製

(1) 免疫原の調製

参考例 12 で得られた化合物 1 ~ 4 は、免疫原性を高める目的で以下の方法で K L H (カルビオケム社製) とのコンジュゲートを作製し、免疫原とした。すなわち、K L H を P B S に溶解して 10 m g / m l に調整し、1 / 10 容量の 25 m g / m l M B S [N-(m-Maleimidobenzoyloxy) succinimide; ナカライテスク社製] を滴下して 30 分攪拌反応させた。あらかじめ P B S で平衡化したセファデックス G - 25 カラムなどのゲルろ過カラムでフリーの M B S を除いて得られた K L H - M B 2.5 m g を 0.1 m o l / l リン酸ナトリウム緩衝液 (P H 7.0) に溶解したペプチド 1 m g と混合し、室温で 3 時間、攪拌反応させた。反応後、P B S で透析したものを免疫原として用いた。

(2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

上記 (1) で調製した化合物 1 ~ 4 の K L H コンジュゲート 100 μ g をそれぞれ水酸化アルミニウムアジュバント (Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p99, 1988) 2 m g および百日咳ワクチン (千葉県血清研究所製) 1×10^9 細胞とともに 5 週令雌 S D ラット各 3 匹に投与した。投与 2 週間後より、各 K L H コンジュゲート 100 μ g を 1 週間に 1 回、計 4 回投与した。該ラットの心臓より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したラットから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。

脾臓を M E M (Minimum Essential Medium) 培地 (日水製薬社製) 中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離 (2450 m/s^2 , 5 分間) した。得られた沈殿画分にトリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH 7.6) を添加し、1 ~ 2 分間処理することにより赤血球を除去した。得られた沈殿画分 (細胞画分) を M E M 培地

で3回洗浄し、細胞融合に用いた。

(3) 酵素免疫測定法 (バインディング E L I S A)

アッセイ用の抗原には参考例12で得られた各化合物をサイログロブリン (以下「THY」という) とコンジュゲートしたものを用いた。作製方法は、架橋剤にMBSの代わりにSMCC [4-(N-Maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylic acid N-hydroxysuccinimido ester; シグマ社] を用いる以外は上記(1)と同様に行った。96ウェルのEIA用プレート (グライナー社) に、上記のように調製したコンジュゲート ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) を $50 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ で分注し、 4°C で一晩放置して吸着させた。該プレートを洗浄後、1%ウシ血清アルブミン (BSA) / PBS を $100 \text{ ml}/\text{ウェル}$ 加え、室温で1時間放置し、残っている活性基をブロックした。

放置後、1%BSA/PBSを捨て、該プレートに被免疫ラット抗血清、モノクローナル抗体の培養上清もしくは精製モノクローナル抗体を $50 \text{ ml}/\text{ウェル}$ 分注し、2時間放置した。該プレートを0.05%ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート [商品名: スパン20 (ICI社商標Tween 20相当品: 和光純薬社製)] / PBS (以下「Tween-PBS」という) で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリンを $50 \text{ ml}/\text{ウェル}$ 加え、室温で1時間放置した。該プレートをTween-PBSで洗浄後、ABTS基質液 (2,2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸) アンモニウム、 $1 \text{ mmol}/1 \text{ ABTS}/0.1 \text{ mol}/1 \text{ クエン酸バッファー (pH4.2)}$) を添加し、発色させてOD415nmの吸光度をプレートリーダー [Emax; Molecular Devices社] を用いて測定した。

(4) マウス骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫細胞株P3X63Ag8U.1 [P3-U1: ATCCより購入] を正常培地 (10%ウシ胎児血清添加RPMI1640培地) で培養し、細胞融合時に 2×10^7 個以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

(5) ハイブリドーマの作製

上記(2)で得られたラット脾細胞と上記(4)で得られた骨髓腫細胞とを10:1になるよう混合し、遠心分離 ($2450 \text{ m}/\text{s}^2$, 5分間) した。得られ

た沈澱画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37℃で、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 2 g、MEM培地 2 ml およびジメチルスルホキシド 0.7 ml の混液を 10^8 個のマウス脾細胞あたり 0.5 ml 加え、該懸濁液に 1～2 分間毎に MEM 培地 1 ml を数回加えた後、MEM 培地を加えて全量が 50 ml になるようにした。

該懸濁液を遠心分離 (900 rpm、5 分間) し、得られた沈澱画分の細胞をゆるやかにほぐした後、該細胞を、メスピペットによる吸込み吸出しでゆるやかに HAT 培地 [10% ウシ胎児血清添加 RPMI 1640 培地に HAT Media Supplement (ベリンガーマンハイム社製) を加えた培地] 100 ml 中に懸濁した。該懸濁液を 96 ウェル培養用プレートに 200 ml / ウェルずつ分注し、5% CO₂ インキュベーター中、37℃で 10～14 日間培養した。

培養後、培養上清を上記 (3) に記載した酵素免疫測定法で調べ、抗原ペプチドに反応してコントロールペプチドに反応しないウェルを選び、そこに含まれる細胞から限界希釈法によるクローニングを 2 回繰り返す、抗ヒト VPLF モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立した。その結果、化合物 2 を抗原に用いて抗ヒト VPLF モノクローナル抗体 KM 2676 を取得した。

図 15 に示すように、KM 2676 は化合物 2 に特異的な反応性を示した (図 15 において、化合物 2 をコートしたウェルを VPLF 2 ペプチドとして示した)。

なお、抗ヒト VPLF モノクローナル抗体 KM 2676 を産生するハイブリドーマ KM 2676 は、平成 12 年 4 月 18 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 : 郵便番号 305-8566) に FERM BP-7137 として寄託されている。

(6) モノクローナル抗体の精製

プリスタン処理した 8 週令ヌード雌マウス (BALB/c) に上記 (5) で得られたハイブリドーマ株を $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞 / 匹それぞれ腹腔内注射した。10～21 日後、ハイブリドーマが腹水癌化することにより腹水のたまったマウスから、腹水を採取 (1～8 ml / 匹) した。

該腹水を遠心分離 (11760 m/s^2 、5 分間) し、固形分を除去した。精

製 Ig G モノクローナル抗体は、カプリル酸沈殿法 (Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) により精製することにより取得した。モノクローナル抗体のサブクラスはサブクラスタイピングキットを用いた ELISA 法により Ig G 2 b と決定された。

〔参考例 14〕 抗ヒト VPLF モノクローナル抗体を用いたヒト VPLF の検出 (ウェスタンブロッティング)

参考例 7 で得られた VPLF ΔN を 100 ng / レーンで SDS-PAGE (5-20% グラジエントゲル、アトー社製) (Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) にて分画した後、PVD F 膜 (ミリポア社製) にブロッティングした。

該膜を 1 % BSA / PBS でブロッキング後、該膜に抗ヒト VPLF モノクローナル抗体 KM 2676 の培養上清を原液で添加し、室温で 2 時間放置した。該膜を Tween-PBS でよく洗浄した後、第二抗体として 1000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン抗体 (ダコ社製) を添加し、室温で 1 時間放置した。

該膜を Tween-PBS でよく洗浄した後、ECL kit (アマシャムファーマシアバイオテック社製) を用いて検出した (図 16)。

図 16 に示すように、抗ヒト VPLF モノクローナル抗体 KM 2676 は、ヒト VPLF (N 末欠失体) の分子量に相当する 20 kDa 付近のバンドに特異的に反応した。

〔実施例 1〕 ヒト VPLF を認識し、その生物活性を阻害するモノクローナル抗体の作製

(1) 免疫原の調製

参考例 7 で得られた昆虫細胞発現 VPLF ΔN 蛋白質 (以下「VPLF ΔN」という。) は、免疫原性を高める目的で以下の方法でキーホールリンペットヘモシアニン (KLH ; カルビオケム社) とのコンジュゲートを作製し、免疫原とした。0.1 mol / l CH₃COONH₄ (pH 7) - 0.15 mol / l NaCl 溶液 800 μl に VPLF ΔN 120 μg を溶解した。該 VPLF 溶液に KLH を 30 μg 加え、さらに 1 % グルタルアルデヒドを 5 μl 加えて室温

で5時間攪拌した。得られた溶液をPBSで透析したものを免疫原として用いた。

(2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

上記(1)で調製したVPLF△NのKLHコンジュゲート30 µgを水酸化アルミニウムアジュバント〔Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p99, 1988〕2 mg及び百日咳ワクチン(千葉県血清研究所製) 1×10^9 細胞とともに6週令雌Balb/cマウス各3匹に投与した。投与2週間後より、KLHコンジュゲート30 µgを1週間に1回、計3回投与した。該マウスの眼底静脈より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したマウスから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。

脾臓をMEM (Minimum Essential Medium) 培地(日水製薬社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離(2450 m/s^2 , 5分間)した。得られた沈殿画分にトリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH7.6)を添加し、1~2分間処理することにより赤血球を除去した。得られた沈殿画分(細胞画分)をMEM培地で3回洗浄し、細胞融合に用いた。

(3) 酵素免疫測定法(バインディングELISA)

アッセイ用の抗原には参考例2で得られたVPLF△Nを用いた。コントロール抗原蛋白質としてはHigh Five細胞の培養上清のヘパリンカラム結合蛋白質を用いた。96ウェルのEIA用プレート(グライナー社)に、上記の抗原蛋白質を2 µg/ml、50 µl/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。該プレートを洗浄後、1% BSA/PBSを100 ml/ウェル加え、室温で1時間放置し、残っている活性基をブロックした。

放置後、1% BSA/PBSを捨て、該プレートに被免疫マウス抗血清、モノクローナル抗体の培養上清若しくは精製モノクローナル抗体を50 ml/ウェル分注し、2時間放置した。該プレートをTween-PBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgGグロブリンを50 ml/ウェル加えて、室温で1時間放置した。該プレートをTween-PBSで洗浄後、ABTS基質液〔2, 2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム、1mmol/l ABTS/ 0.1mol/l クエン酸バッファー(pH4.2)〕を添加し、発色させてOD415 nmの吸光度をプレートリーダー(Emax; Molecular Devices社)を用いて測定した。

(4) マウス骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫細胞株P3X63Ag8U.1 (P3-U1: ATCCより購入) を正常培地 (10%ウシ胎児血清添加RPMI 1640培地) で培養し、細胞融合時に 2×10^7 個以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

(5) ハイブリドーマの作製

上記(2)で得られたマウス脾細胞と上記(4)で得られた骨髓腫細胞とを10:1になるよう混合し、遠心分離 (2450 m/s^2 , 5分間) した。得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37℃で、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 2 g、MEM培地 2 ml 及びジメチルスルホキシド 0.7 ml の混液を 10^8 個のマウス脾細胞あたり 0.5 ml 加え、該懸濁液に1~2分間毎にMEM培地 1 ml を数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50 ml になるようにした。

該懸濁液を遠心分離 (900 rpm, 5分間) し、得られた沈澱画分の細胞をゆるやかにほぐした後、該細胞を、メスピペットによる吸込み吸出しでゆるやかにHAT培地 [10%ウシ胎児血清添加RPMI 1640培地にHAT Media Supplement (ベーリンガーマンハイム社製) を加えた培地] 100 ml 中に懸濁した。該懸濁液を96ウェル培養用プレートに200 ml /ウェルずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で10~14日間培養した。

培養後、培養上清を上記(3)に記載した酵素免疫測定法で調べ、VPLF△Nに反応してコントロール抗原蛋白質に反応しないウェルを選び、そこに含まれる細胞から限界希釈法によるクローニングを2回繰り返し、抗ヒトVPLFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立した。その結果、ハイブリドーマKM 2764~2772を取得した。

図17に示すように、これらはVPLF△Nに特異的な反応性を示した。

なお、抗VPLFモノクローナル抗体KM 2764及びKM 2767を産生するハイブリドーマ細胞株KM 2764及びKM 2767は、平成12年9月7日付で、ブダペスト条約に基づき独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6) に、それぞれFERM BP-7293及びFERM BP-7294として寄託されている。

(6) モノクローナル抗体の精製

プリスタン処理した8週令ヌード雌マウス (BALB/c) に上記 (5) で得られたハイブリドーマ株を $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹それぞれ腹腔内注射した。10～21日後、ハイブリドーマが腹水癌化することにより腹水のたまったマウスから、腹水を採取 (1～8 ml/匹) した。

該腹水を遠心分離 (11760 m/s^2 、5 分間) し、固形分を除去した。精製IgGモノクローナル抗体は、カプリル酸沈殿法 [Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988] により精製することによって取得した。モノクローナル抗体のサブクラスは、サブクラスタイピングキットを用いたELISA法により、表1のように決定された。

表1

抗ヒトVPLFモノクローナル抗体の抗体クラス

| KM 番号 サブクラス | |
|-------------|----|
| KM2764 | G1 |
| KM2765 | G1 |
| KM2766 | G1 |
| KM2767 | G1 |
| KM2768 | G1 |
| KM2769 | G1 |
| KM2770 | G1 |
| KM2771 | M |
| KM2772 | M |

〔実施例2〕抗ヒトVPLFモノクローナル抗体の反応特異性の検討

抗VPLFモノクローナル抗体の反応特異性を実施例1 (3) に示したバインディングELISA法により検討した。抗原には実施例1 (3) で用いた Δ N-VPLFの他、昆虫細胞発現VEGF、PDGF AA (R&D社製)、PDGF BB (R&D社製)、PDGF AB (R&D社製) を用いた。結果を図18に示す。

図18によれば、KM2764～2770はいずれもVEGFには交叉反応を示さなかったが、KM2765、KM2768及びKM2770はPDGFに交

交叉反応を示した。KM 2 7 6 4、KM 2 7 6 6、KM 2 7 6 7 及び KM 2 7 6 9 は V P L F に特異的な反応性を示した。また、抗 V E G F モノクローナル抗体は V E G F に反応した他、V P L F と P D G F に交叉反応を示し、ウサギ抗 P D G F ポリクローナル抗体（ジェンザイム社製）は P D G F に反応した他、わずかに V E G F にも交叉反応を示した。

〔実施例 3〕抗ヒト V P L F モノクローナル抗体を用いたヒト V P L F の生物活性の阻害

参考例 10 に記した V P L F のラット由来平滑筋細胞 R S M C に及ぼす増殖促進活性に対して抗ヒト V P L F モノクローナル抗体が阻害活性を有するか否かを調べた。

96ウェルコラーゲンコートプレート（IWAKI社製）に、10%牛胎児血清（FBS）、ペニシリン（GIBCO BRL社製）100unit/ml、ストレプトマイシン（GIBCO BRL社製）100 μ g/ml を添加した M-199 培地（GIBCO BRL社製）に浮遊させた R S M C を 3000 個/200 μ l/ウェルとなるように加え、37℃のCO₂インキュベーター中で1日間培養した。培養後、Opti-MEM 培地（GIBCO BRL社製）を用いて2回培地交換し、さらに1日間培養した。培地除去後、各ウェルにOpti-MEM 培地で希釈した抗ヒト V P L F モノクローナル抗体 KM 2 7 6 4 ～ 2 7 7 0 （終濃度 0.04 μ g/ml ～ 1 μ g/ml）、又は可溶性 PDGF レセプター α 若しくは β （R&D社製；終濃度 0.04 μ g/ml から 5 μ g/ml）をそれぞれ 50 μ l/ウェル添加し、37℃で30～60分間反応させた。コントロール抗体として KM511（抗 ND28 モノクローナル抗体）を同様に反応させた。さらに Opti-MEM 培地で希釈した V P L F Δ N（終濃度 300ng/ml）又はヒト P D G F B B（R&D社製；終濃度 50ng/ml）を 50 μ l/ウェル添加し、37℃のCO₂インキュベーター中で2日間培養した。培養終了後、各ウェルに 10 μ l ずつ WST-1 反応試薬（ベーリンガーマンハイム社製）を添加し、37℃のCO₂インキュベーター中で3時間培養した。培養終了後、OD450nmの吸光値を測定した。

図 19 に示すように、V P L F Δ N の R S M C に対する増殖促進活性は、コントロール抗体では全く阻害されないのに対し、KM 2 7 6 4 と KM 2 7 6 7 により抗体濃度依存的に阻害された。また、KM 2 7 6 4 と KM 2 7 6 7 は P D G F B B の R S M C に対する増殖促進活性は全く阻害しないことから、これらの抗

体はV P L F特異的な阻害活性を有することが示された。

〔実施例4〕抗ヒトV P L Fモノクローナル抗体を用いたヒトV P L Fの定量サンドイッチE L I S A法によるヒトV P L Fの定量を検討した。

まず抗V P L Fモノクローナル抗体K M 2 7 6 4のビオチン標識体を作製した。K M 2 7 6 4はP B Sに1 m g / m lの濃度で溶解し、4分の1容量の0. 5 m o l / l炭酸バッファー (PH 9. 2)を加え、さらに1 m g / m lの濃度でジメチルホルムアミドに溶解したSulfo-NHS-Lc-Biotin (ピアス社製)を抗体溶液の4分の1容量、攪拌下で添加した。室温で3時間、攪拌下で反応させた後、P B Sで一晩透析してビオチン標識K M 2 7 6 4を得た。

抗ヒトV P L Fモノクローナル抗体K M 2 7 6 7は96ウェルのE I A用プレートに、10 μ g / m lの濃度で、50 μ l / ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。該プレートを洗浄後、1%BSA/PBSを100 m l / ウェル加え、室温で1時間放置し、残っている活性基をブロックした。

放置後、1% BSA/PBSを捨て、該プレートに1%BSA/PBSで希釈したV P L F Δ N及び昆虫細胞発現V E G F 1 6 5 (0. 49 n g / m l ~ 1 0 0 0 n g / m l)を50 m l / ウェル分注し、4℃で一晩放置した。該プレートをTween-PBSで洗浄後、上記のように調製したビオチン標識K M 2 7 6 4を10 μ g / m lの濃度で、50 m l / ウェル加えて、室温で2時間放置した。該プレートをTween-PBSで洗浄後、HRP-Avidin (ベクター社製)を50 m l / ウェル加えて、室温で1時間放置した。該プレートをTween-PBSで洗浄後、ABTS基質液を添加して発色させ、OD415 nmの吸光度をプレートリーダーを用いて測定した。図20に示すように、K M 2 7 6 7とビオチン標識K M 2 7 6 4を用いたサンドイッチE L I S AによりV P L Fを特異的に定量することが可能であった。検出限界はおよそ10 n g / m lであった。

産業上の利用可能性

本発明によれば、ヒトV P L Fに特異的に反応し、かつその活性を阻害するモノクローナル抗体を作製し、V P L Fの関与する疾患、すなわち、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、

平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メサングウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓 β 細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患の治療薬又は診断薬として利用することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号 3：人工的に合成したオリゴキャップリンカー配列

配列番号 4：人工的に合成したオリゴ（dT）プライマー配列

配列番号 5～27：人工的に合成したプライマー配列

配列番号 28～31：人工的に合成したペプチド配列

配列番号 32及び33：人工的な融合ポリペプチド配列

配列番号 34：市販のプラスミドpMbac（STRATAGENE社製）に含まれる部分配列

配列番号 35：配列番号 32の合成ペプチドのN末端配列

配列番号 36：配列番号 33の合成ペプチドのN末端配列

請 求 の 範 囲

1. 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質を特異的に認識し、かつ該蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する抗体。
2. 配列番号 1 における第 227 アミノ酸～第 345 アミノ酸に存在するエピソードを認識する請求項 1 記載の抗体。
3. 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質を特異的に認識し、かつ、該蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する抗体。
4. 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列と 60 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質を特異的に認識し、かつ、該蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する抗体。
5. 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の部分配列を含み、VEGF/PDGF スーパーファミリーに属する因子間で保存されている 8 個のシステイン残基を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質を特異的に認識し、かつ、該蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する抗体。
6. 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の部分配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、VEGF/PDGF スーパーファミリーに属する因子間で保存されている 8 個のシステイン残基を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質を特異的に認識し、かつ、該蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する抗体。
7. 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において N 末から少なくとも 226 番目までのアミノ酸が欠失されたアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質を特異的に認識し、かつ、該蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する抗体。

8. 配列番号 32 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質を特異的に認識し、かつ、該蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する抗体。
9. 配列番号 33 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質を特異的に認識し、かつ、該蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する抗体。
10. 蛋白質の有する増殖因子としての活性が平滑筋細胞に対する増殖促進活性である請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の抗体。
11. 平滑筋細胞が、ラット由来である請求項 10 に記載の抗体。
12. 抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の抗体。
13. モノクローナル抗体がマウスモノクローナル抗体である請求項 12 記載のモノクローナル抗体。
14. モノクローナル抗体がIgG1サブクラスである請求項 12 記載の抗体。
15. マウスモノクローナル抗体がIgG1サブクラスである請求項 13 記載の抗体。
16. ハイブリドーマ細胞株KM2764 (FERM BP-7293) により産生されるモノクローナル抗体。
17. ハイブリドーマ細胞株KM2767 (FERM BP-7294) により産生されるモノクローナル抗体。
18. 請求項 12 記載のモノクローナル抗体の部分断片からなる抗体断片。
19. 請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の抗体又は請求項 18 記載の抗体断片と、放射性同位元素、蛋白質又は低分子の薬剤とを結合させた抗体の誘導体。
20. 請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。
21. ハイブリドーマ細胞株KM2764 (FERM BP-7293) である請求項 20 記載のハイブリドーマ。
22. ハイブリドーマ細胞株KM2767 (FERM BP-7294) である請求項 20 記載のハイブリドーマ。
23. 請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の抗体、請求項 18 記載の抗体断片又は請求項 19 記載の抗体の誘導体をコードするDNA。
24. 請求項 23 記載のDNAを含有する組換えベクター。

25. 請求項24記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

26. 請求項25記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に請求項1～17のいずれか1項に記載の抗体、請求項18記載の抗体断片又は請求項19記載の誘導体を生成蓄積させ、該培養物から該抗体、該抗体断片又は該誘導体を採取することを特徴とする、抗体、抗体断片又は誘導体の製造方法。

27. 請求項1～17のいずれか1項に記載の抗体、請求項18記載の抗体断片又は請求項19記載の抗体の誘導体を含有する医薬。

28. 請求項1～17のいずれか1項に記載の抗体、請求項18記載の抗体断片又は請求項19記載の抗体の誘導体を含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患及び腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも1種の疾患の治療薬。

29. 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内障からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リュウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、C r o w - F u k a s e 症候群及び卵巣過剰刺激症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎である請求項28記載の治療薬。

30. 請求項1～17のいずれか1項に記載の抗体、請求項18記載の抗体断片又は請求項19記載の抗体の誘導体を含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓 β 細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選

択される少なくとも1種の疾患の診断薬。

31. 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内障からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リュウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、C r o w - F u k a s e 症候群及び卵巣過剰刺激症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メサンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎であり、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、膵臓 β 細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される請求項30記載の診断薬。

32. 請求項1～17のいずれか1項に記載の抗体、請求項18記載の抗体断片又は請求項19記載の抗体の誘導体を用いて以下の(a)～(j)からなる群より選択される少なくとも1種の蛋白質を免疫学的に定量する方法：

(a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質；

(b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号1で示されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；

(d) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列を含み、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子間で保存されている8個のシステイン残基を含み、かつ配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、VEGF/PDGFスーパー

ファミリーに属する因子間で保存されている 8 個のシステイン残基を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において N 末から少なくとも 226 番目までのアミノ酸が欠失されたアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；

(g) 配列番号 32 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質；

(h) 配列番号 33 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質；

(i) 蛋白質の有する増殖因子としての活性が平滑筋細胞に対する増殖促進活性である上記 (a) ~ (h) のいずれかに記載の蛋白質；及び

(j) 平滑筋細胞が、ラット由来である上記 (i) に記載の蛋白質。

33. 請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の抗体、請求項 18 記載の抗体断片又は請求項 19 記載の抗体の誘導体を用いて以下の (a) ~ (j) からなる群より選択される少なくとも 1 種の蛋白質を免疫学的に検出する方法：

(a) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質；

(b) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列と 60% 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；

(d) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の部分配列を含み、VEGF/PDGF スーパーファミリーに属する因子間で保存されている 8 個のシステイン残基を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の部分配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、VEGF/PDGF スーパーファミリーに属する因子間で保存されている 8 個のシステイン残基を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性

を有する蛋白質；

(f) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において N 末から少なくとも 226 番目までのアミノ酸が欠失されたアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質；

(g) 配列番号 32 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質；

(h) 配列番号 33 で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質；

(i) 蛋白質の有する増殖因子としての活性が平滑筋細胞に対する増殖促進活性である上記 (a) ~ (h) のいずれかに記載の蛋白質；及び

(j) 平滑筋細胞が、ラット由来である上記 (i) に記載の蛋白質。

34. 請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の抗体、請求項 18 記載の抗体断片又は請求項 19 記載の抗体の誘導体を用いて、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メサングウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓 β 細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも 1 種の疾患を検出する方法。

35. 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内障からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リュウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾皮症であり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukase 症候群及び卵巣過剰刺激症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メサングウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎であり、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、膵臓 β 細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される請求項 34 記載の方法。

1

| | | | |
|--------|-----|--|---|
| VEGF | 43 | FM-DVYQRSYCHPIETLVDIFQDPDEIEYINK--PSCVPLMRGG--CCND--EGLBC | * |
| VEGF-B | 38 | WI-DVYTRATCQPREVVPLTVBLMGTVAKQLV--PSCVTVQRGG--CCPD--DGLBC | |
| VEGF-C | 121 | SIDNFWRKTCQMPREVCIDVCKDFGVANINIFK--PPCVSVYRGG--CCNS--EGLBC | |
| VEGF-D | 101 | VIDFWQRTQCSPRETCVEVASDLGKSNINIFK--PPCVNVFRGG--CCNE--ESLIC | |
| PDGF-A | 87 | SI-DEAVPAVCKTRTVIYEIPRSQVDPISANLWPCVEVKRCTG--CCNT--SSVKG | |
| PDGF-B | 88 | IA-EPAMIAECKTRTEVFEISRRLIDFNANLWPCVEVKRCTG--CCNN--RNVQC | |
| P1GF | 43 | FQ-DVWGRSYCRALERLVDVVSDEYPSVEVHMFS--PSCVSLIRCTG--CCGD--EDLHC | |
| NZ2 | 33 | -----GSECKPRPIVWPVSETHPELTSQRN--PPCVTLMRGG--CCND--ESLBC | |
| NZ7 | 44 | -----SGCKPRDTVWYLGEDYPESTNLQYN--PPCVTVKRCSTG--CCNG--DGQIC | |
| VPLF | 241 | LT-DEVRLYSCTRNFSVSR-DELRDITW--PSCVLLVRCGGNCA--CC--LHNCNECA--CC | * |

| | | | |
|--------|-----|--|---|
| VEGF | 144 | VPTEESNITMQIMRIKPHQGH-----IGEMSEFLQINKFCGRPKKDRARQ--EKKS | |
| VEGF-B | 137 | VTGQHQRMQIMIRYPSSQ-----IGEMSEFLQINKFCGRPKKDSAV--K-PDS | |
| VEGF-C | 227 | MNTSTSYLSKTLFEITVPLSQGP-----KPTISFANITSCRCMSKLDVYRQVHSIIRR | |
| VEGF-D | 207 | MNTSTSYISKQLEISVPLTSVP-----ELVPVKVANITGCKCLPTAPRHPYSIIRRSI | |
| PDGF-A | 188 | QPSRVHHRSVKAKVEYVRKKPK-----LKEVQVRDEHLEACATTSLN--PDY | |
| PDGF-B | 190 | RPTQVQLRPVQVRKIEIVRKKPI-----FKKATVTEDILACKCETVAAAR--PVT | |
| P1GF | 141 | VPVETANVTMQLKIRSGDRPS-----YVELTFSQIVRCEGRPLREKMK--PER | |
| NZ2 | 124 | VPTEEENVNVTMELGASGSGSNG-----MQRLSFVEHKKCDGRPRFTIT--PPT | |
| NZ7 | 142 | TAVETRNTTIVTVSGTVSSSGTNSGVSTNQRISVTEHTKDCIGRTTIT--PTT | |
| VPLF | 345 | VPKVTCKYHEVQLRPKTCVRG---LHKSITDVAHHEDECDVCRGSIGG----- | * |

図 2

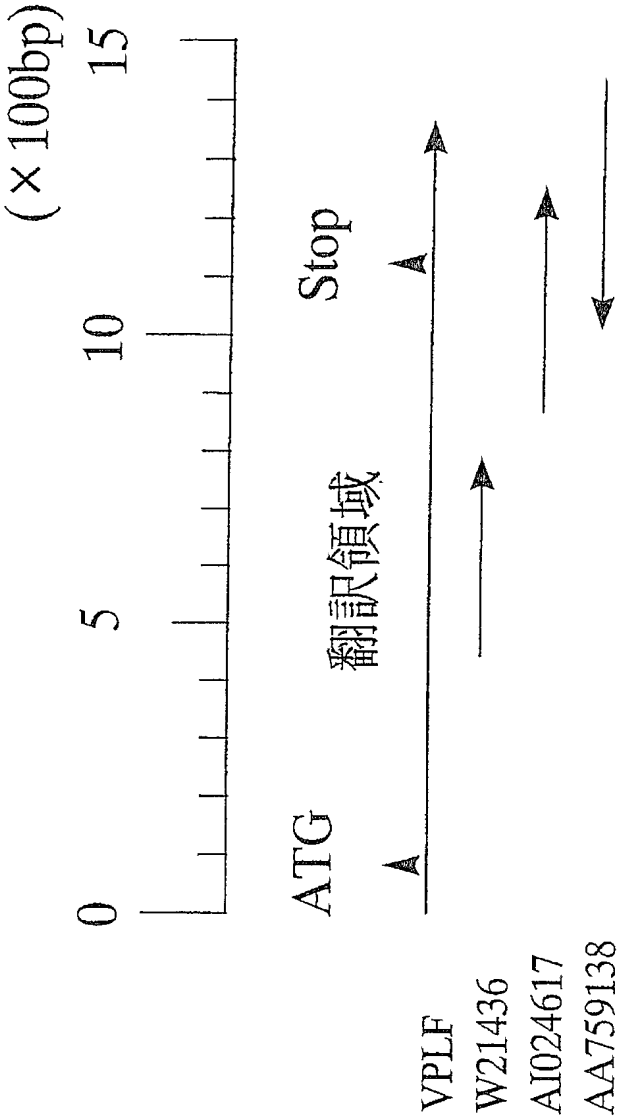
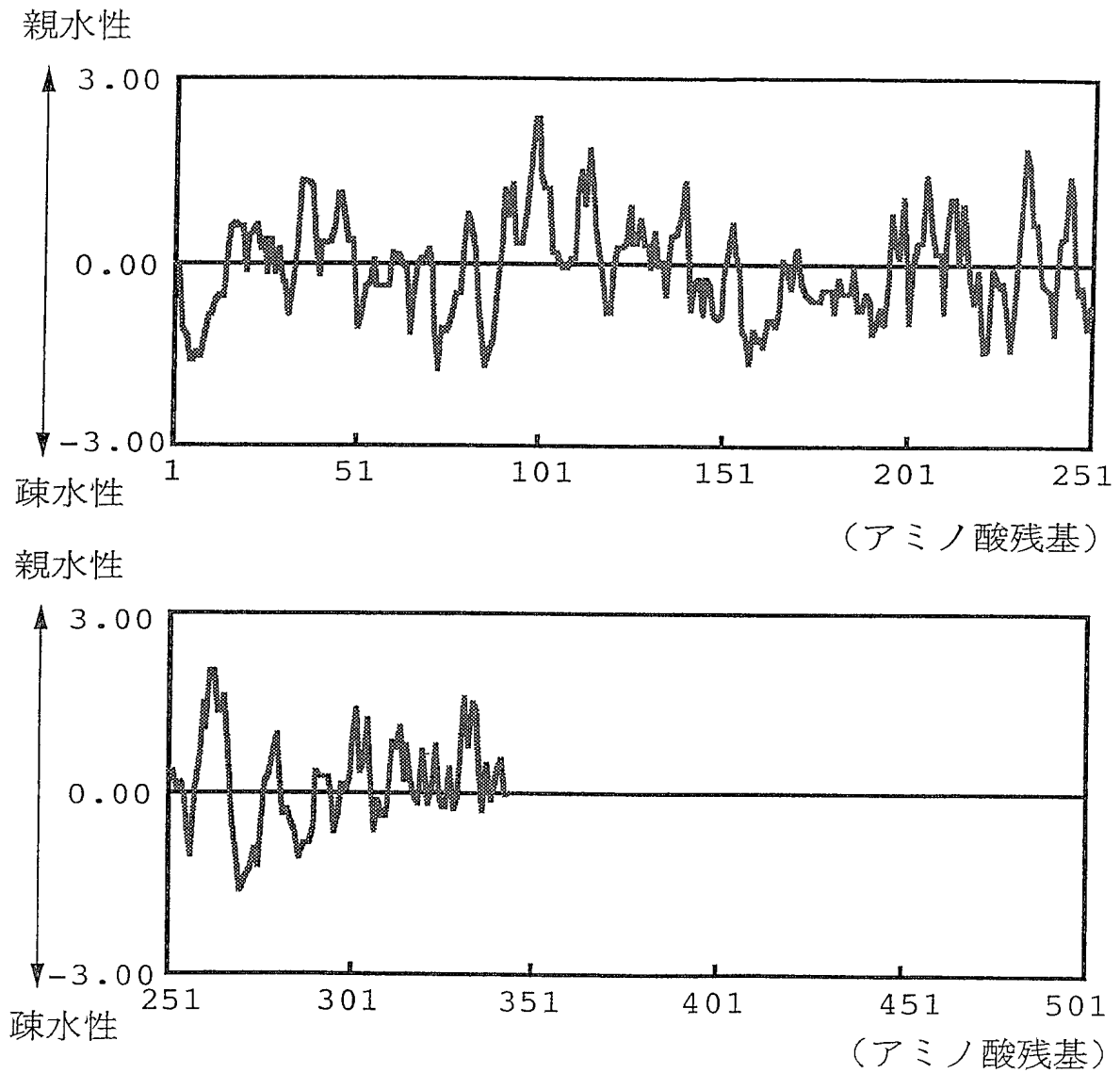
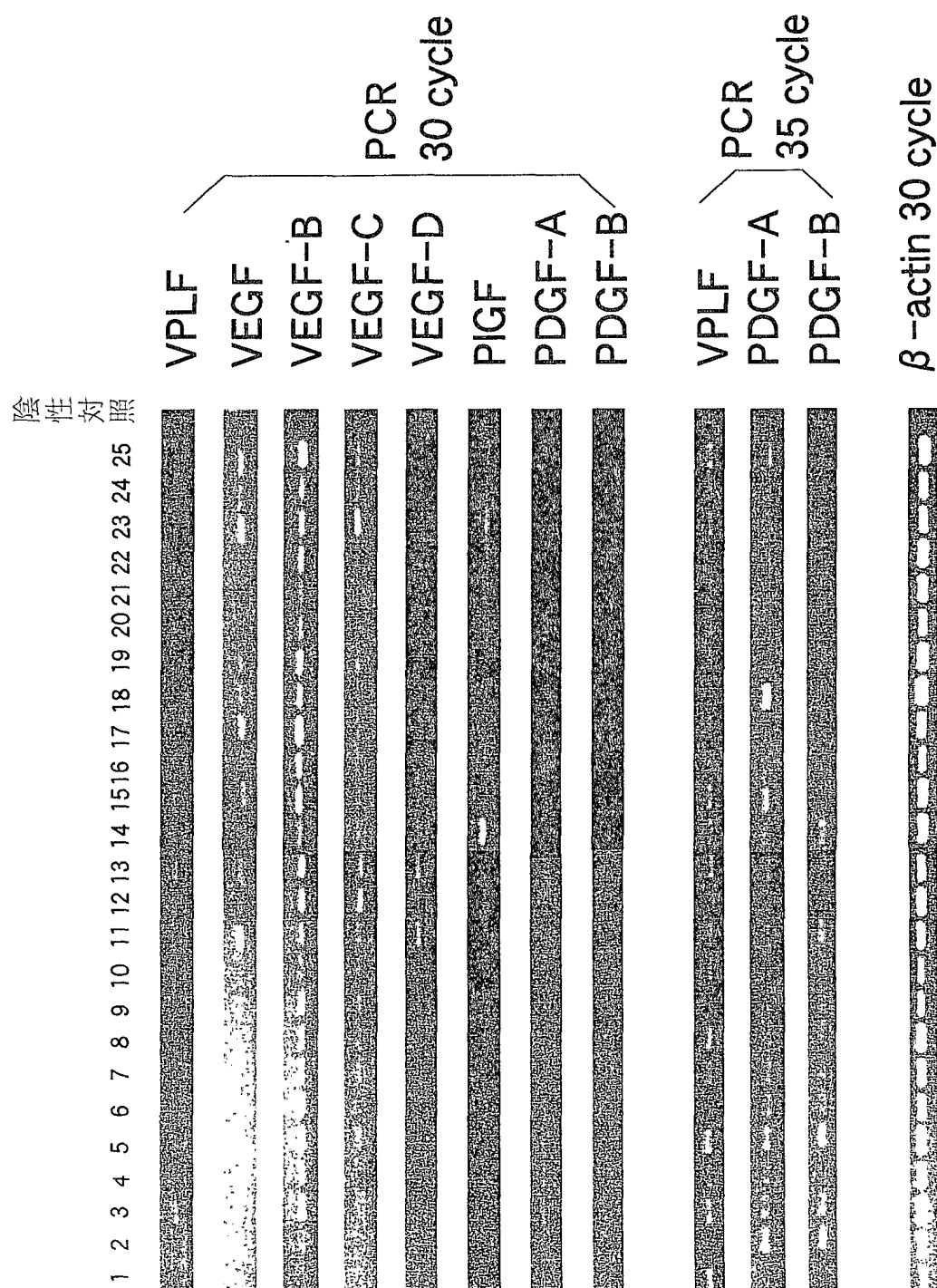
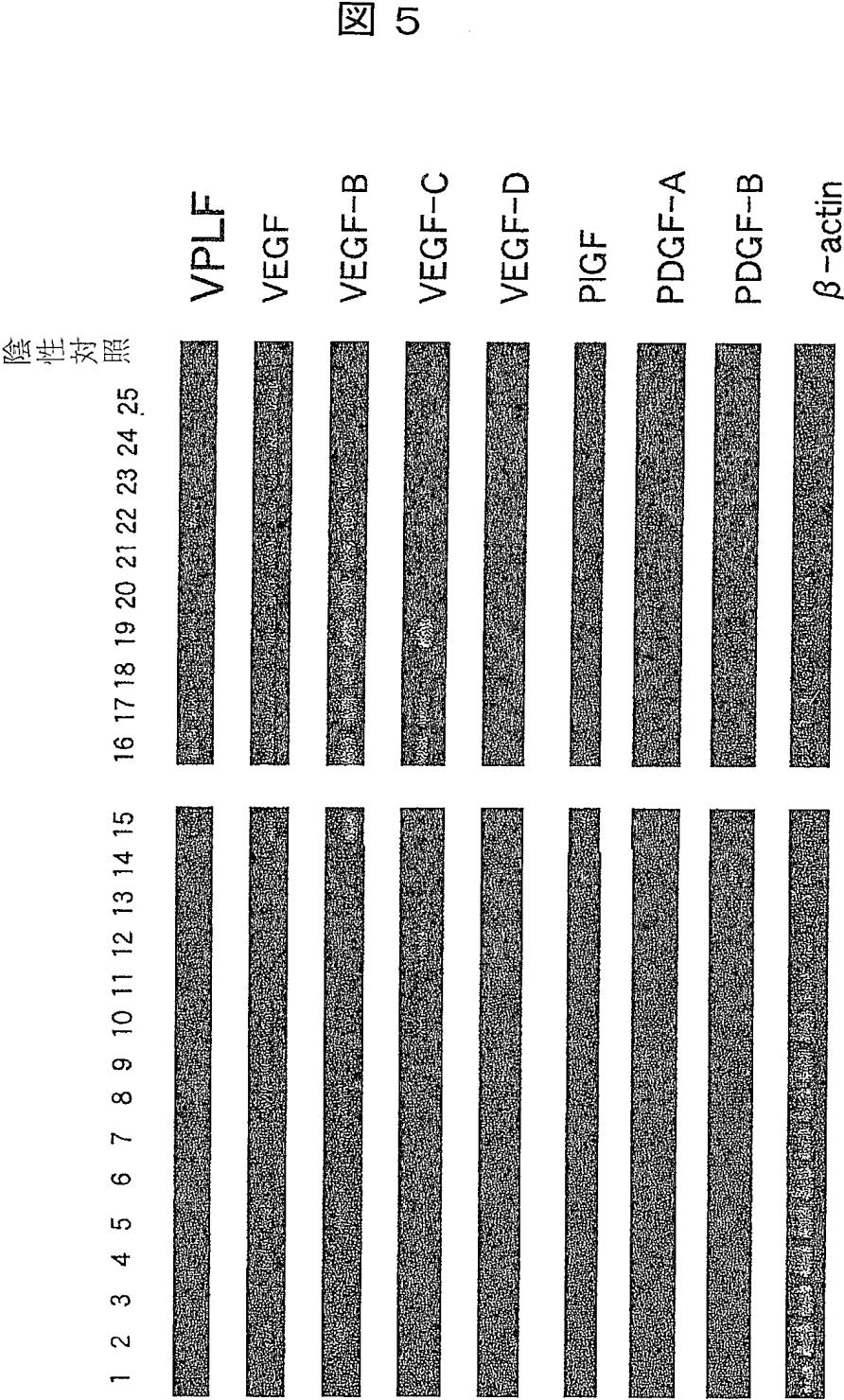


図 3







5

図 6

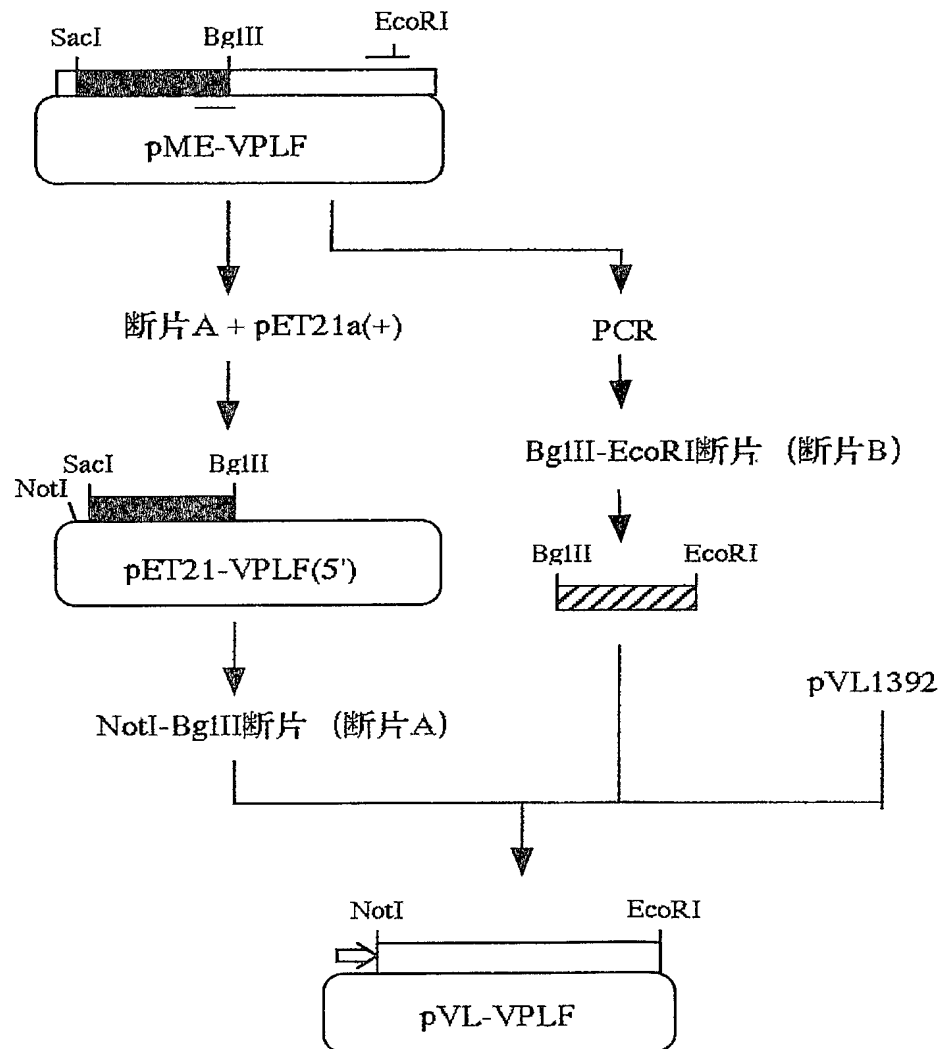


図 7

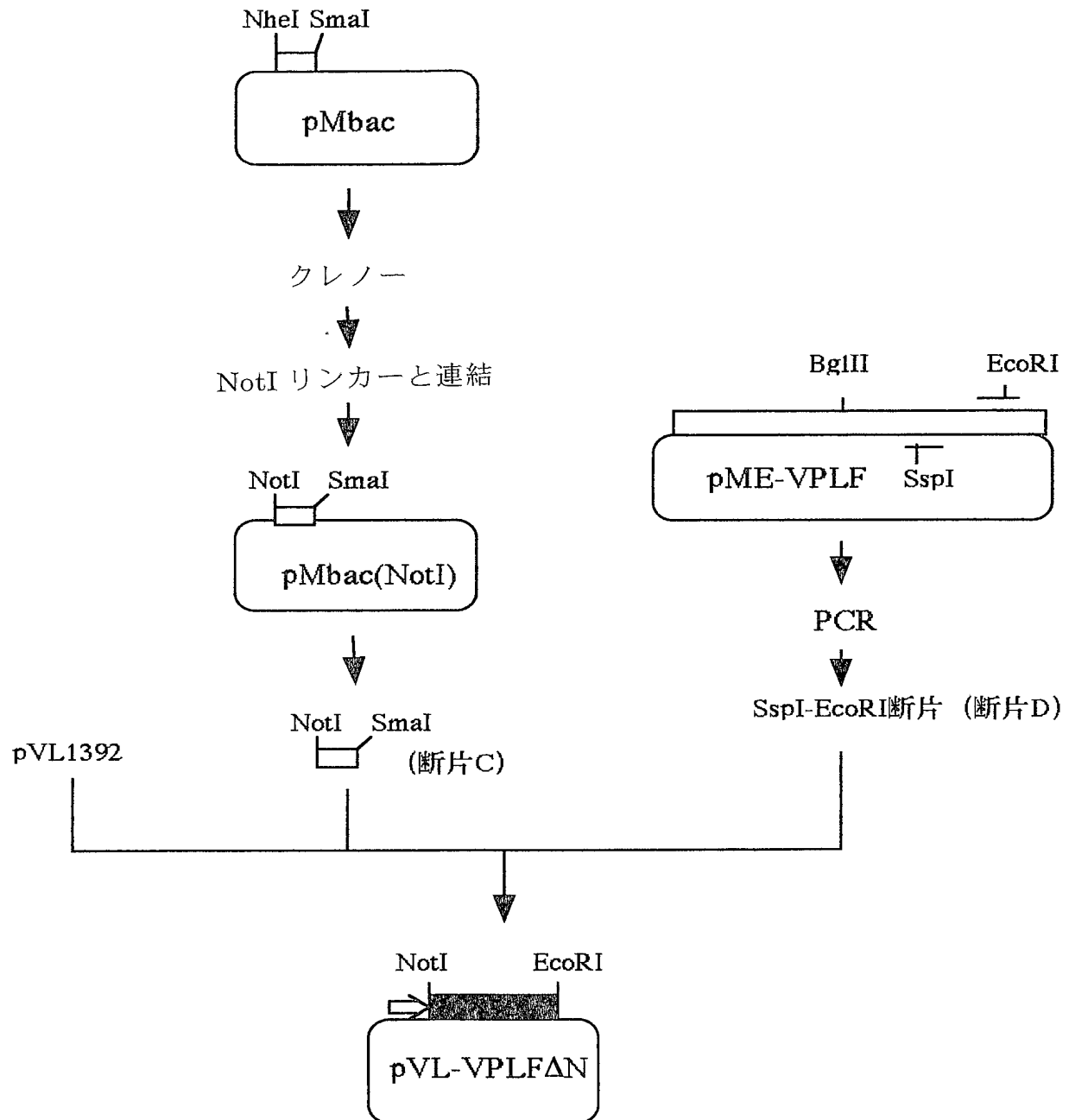


図 8

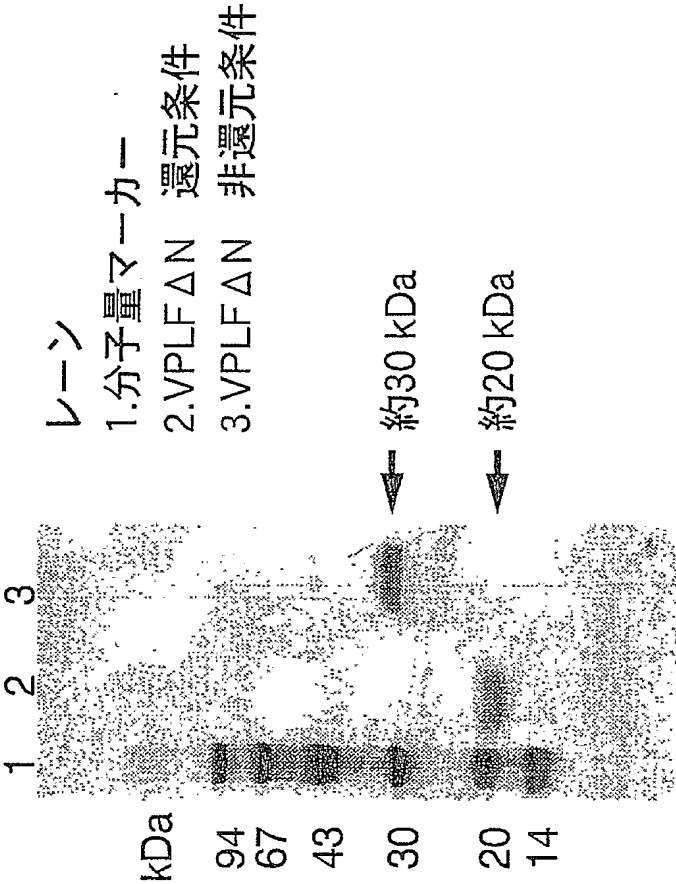


図 9

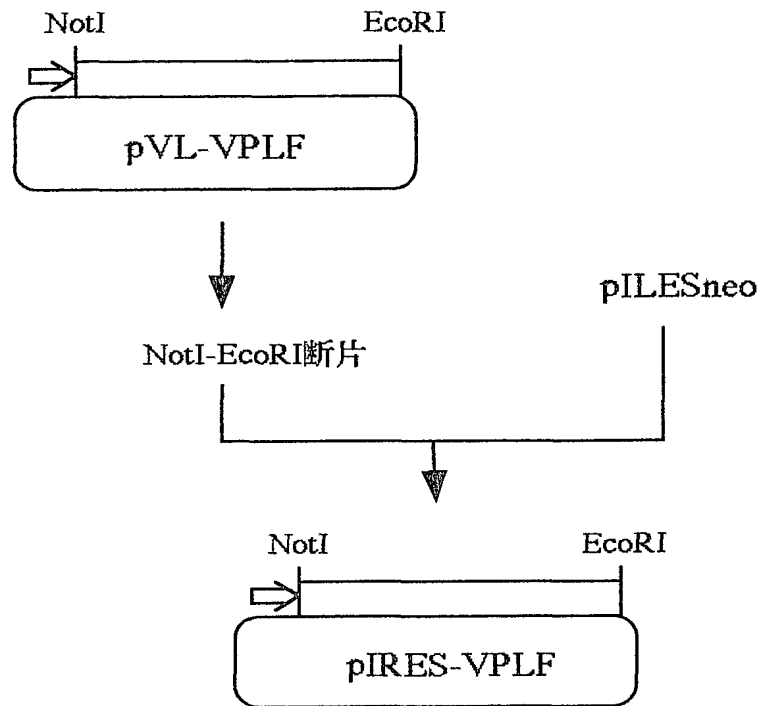


図 10

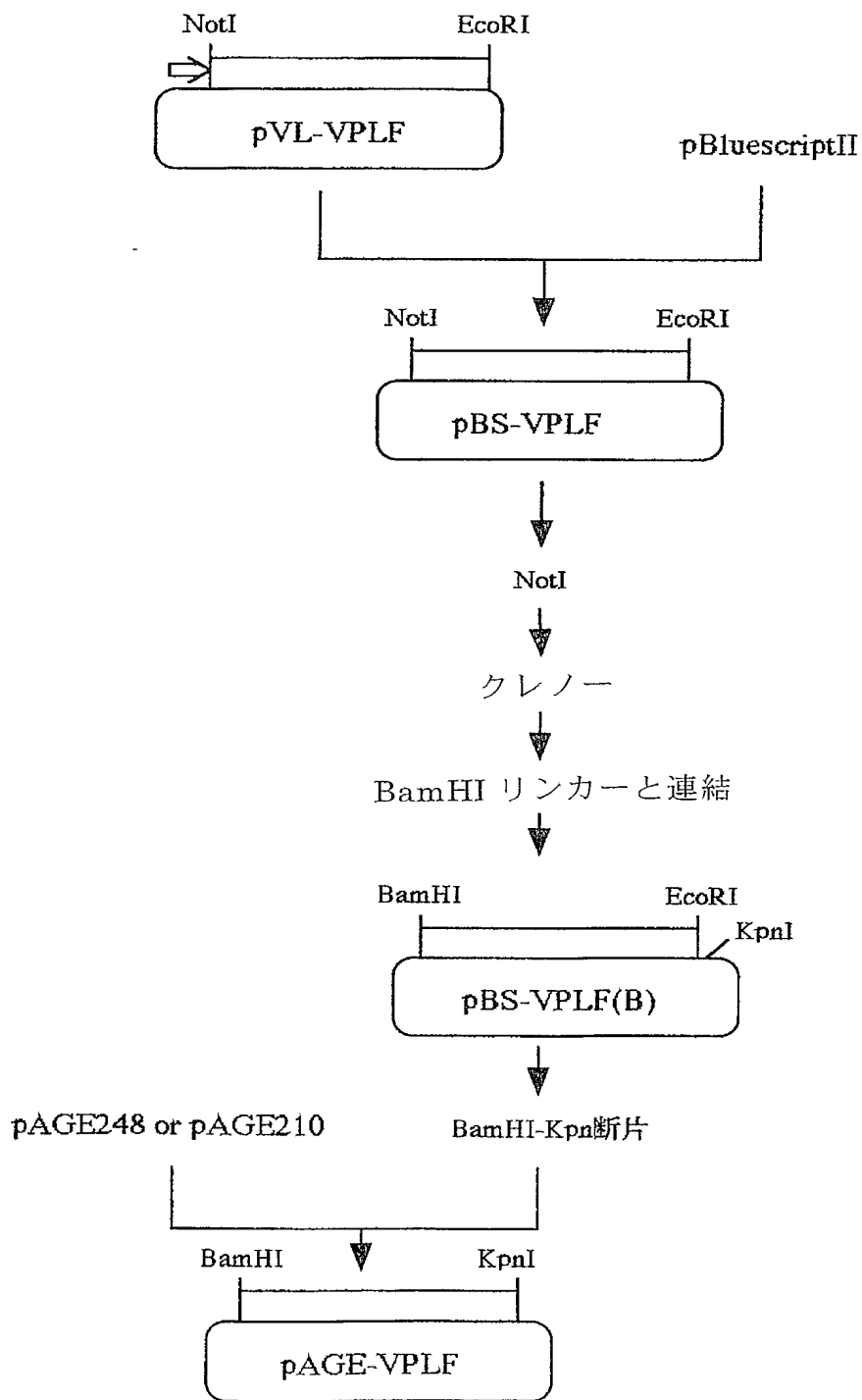


図 11

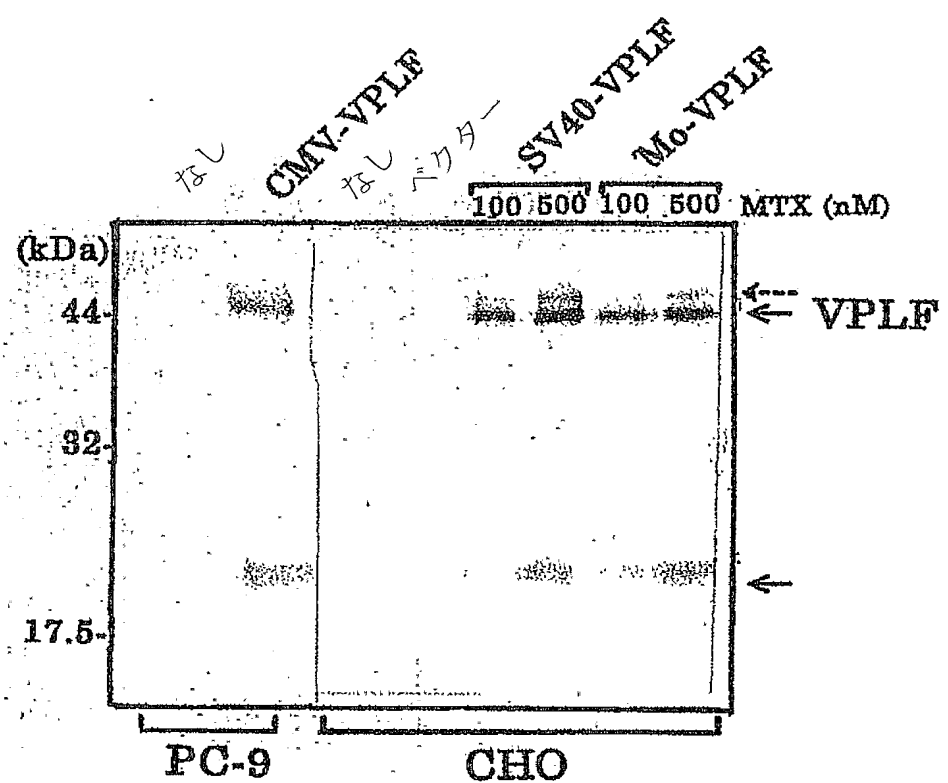


図 12

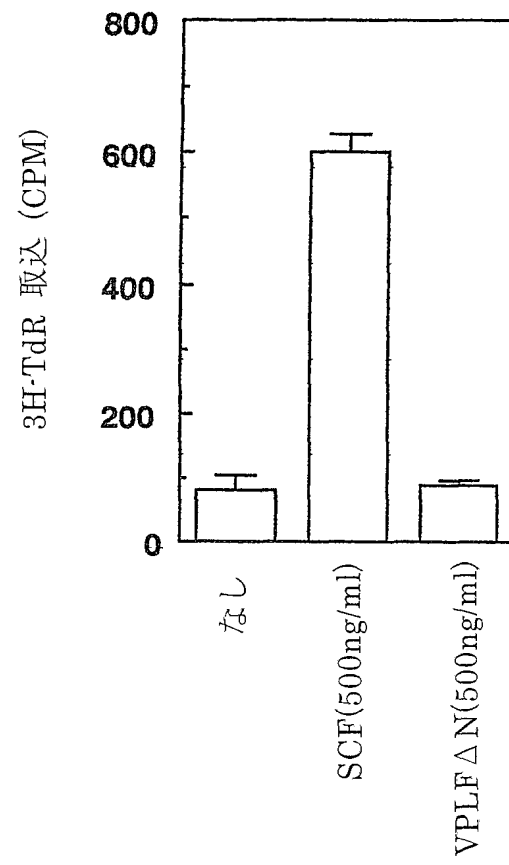


図 13

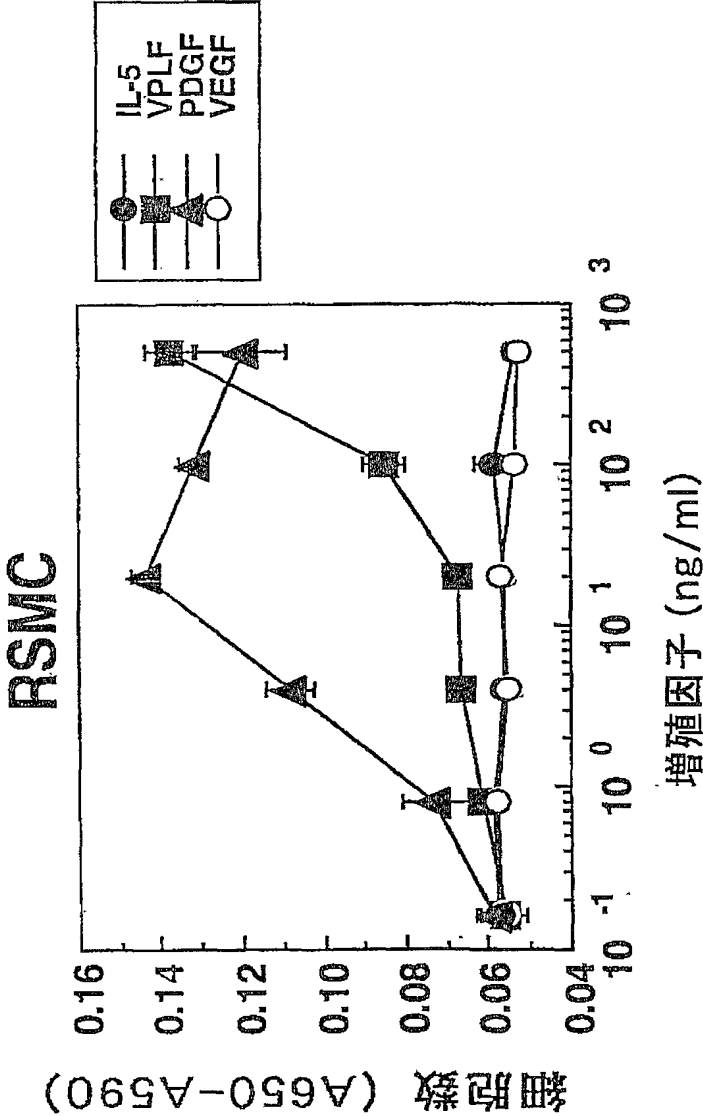


図 14

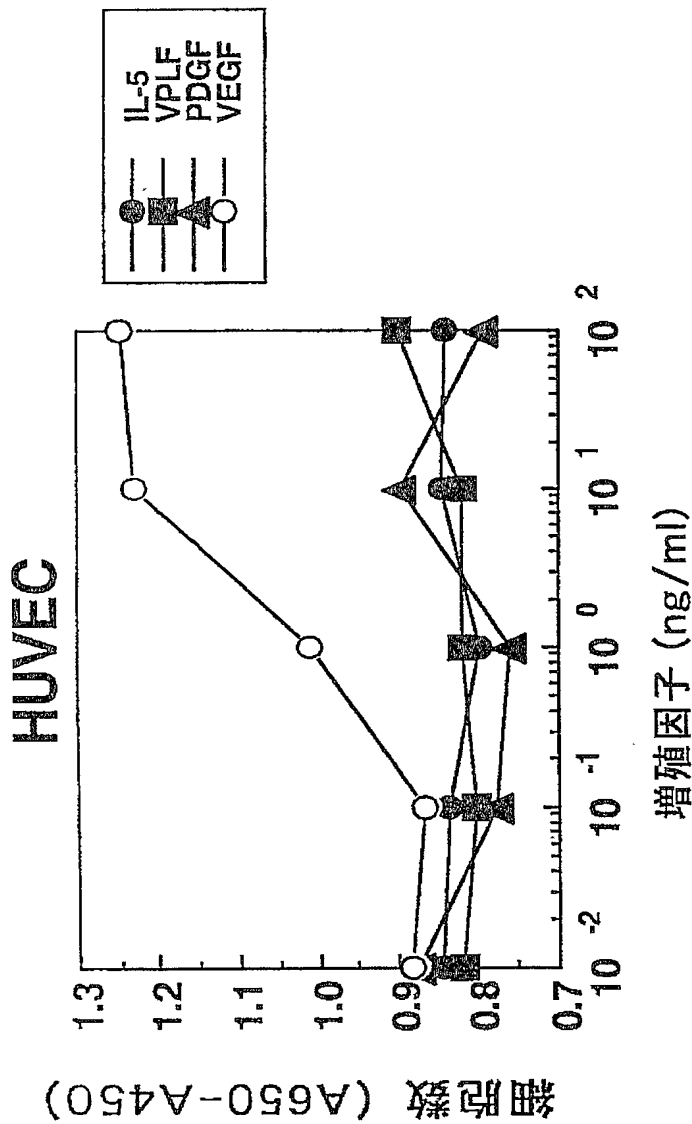


図 15

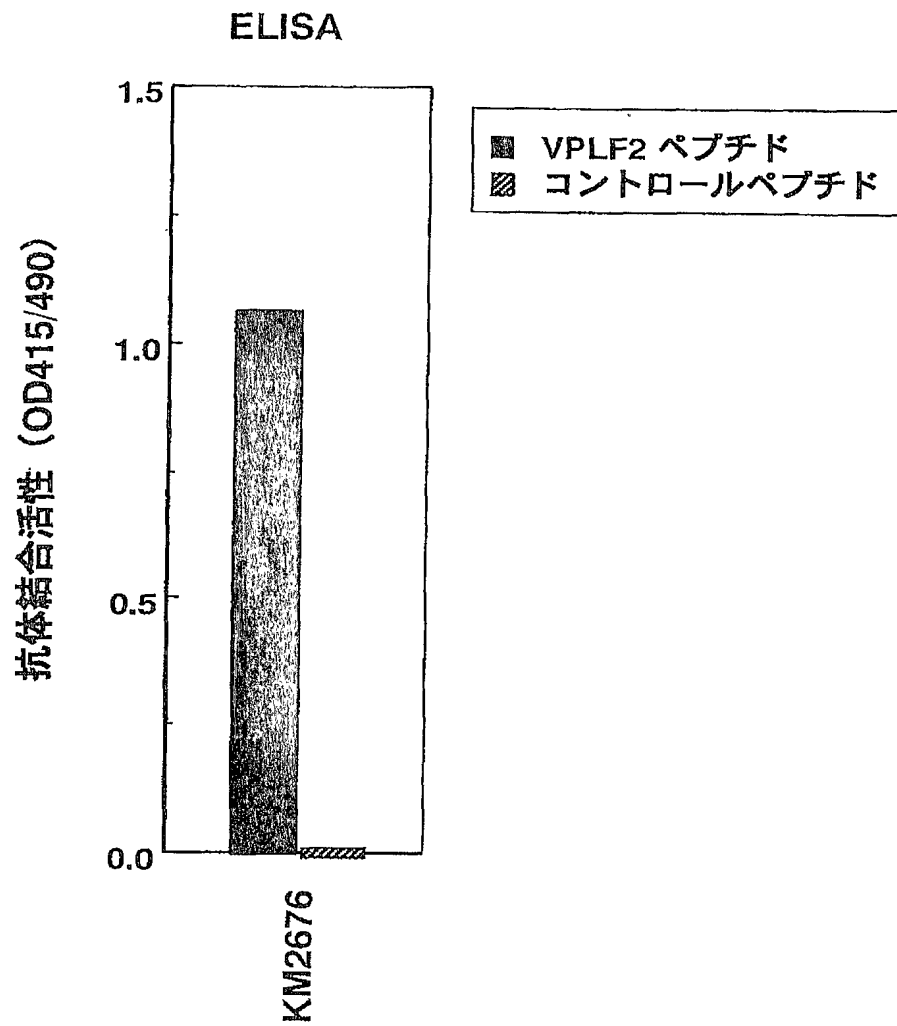


図 16

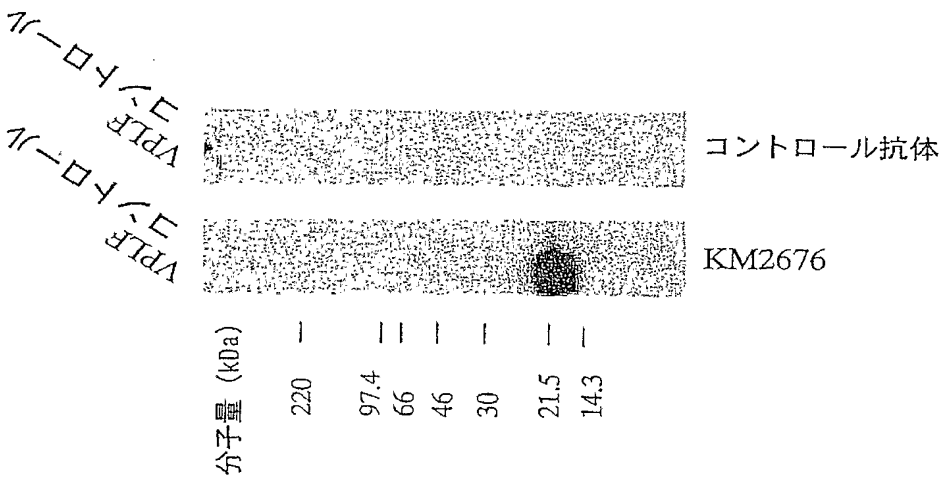
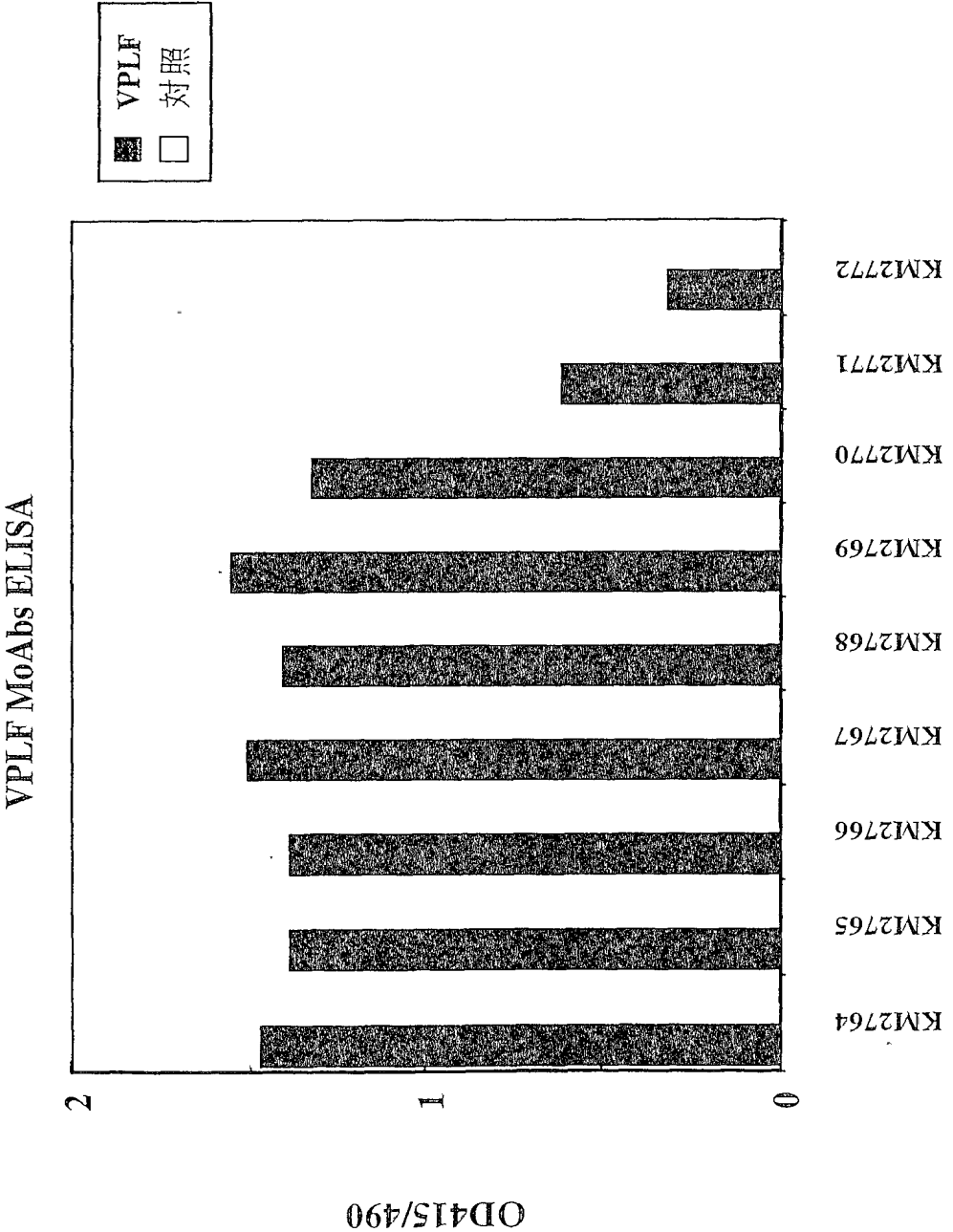


図 17



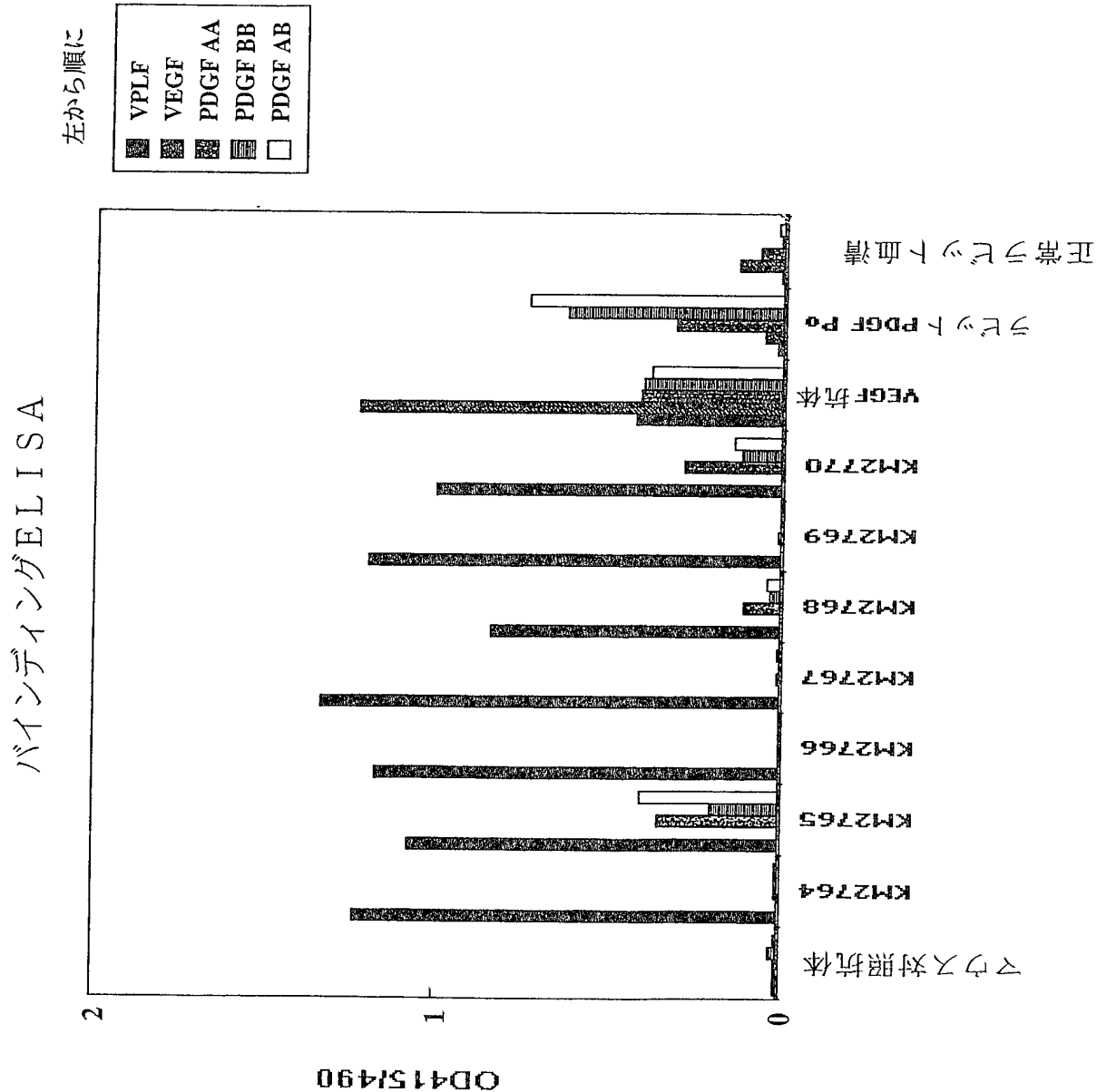


図 19

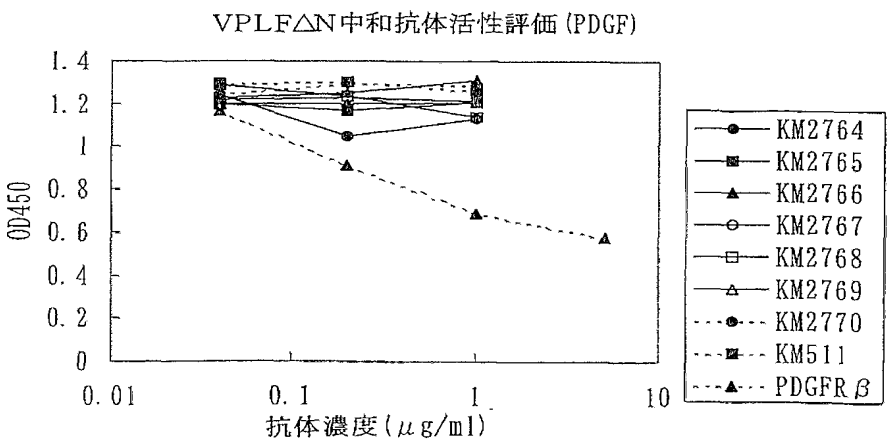
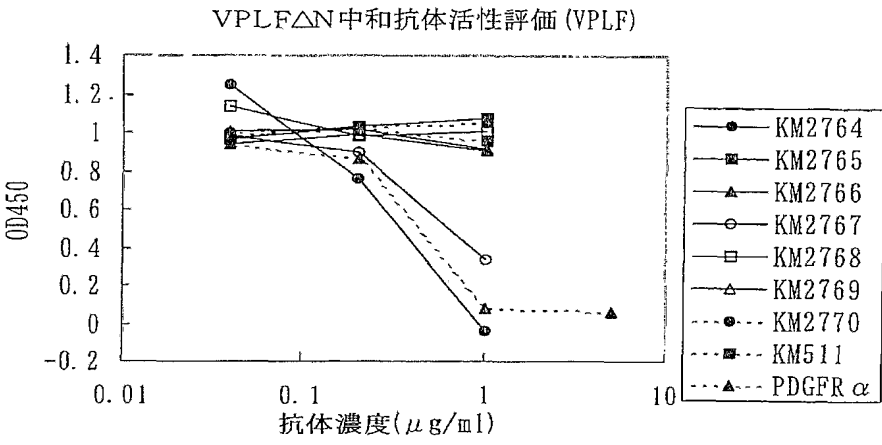
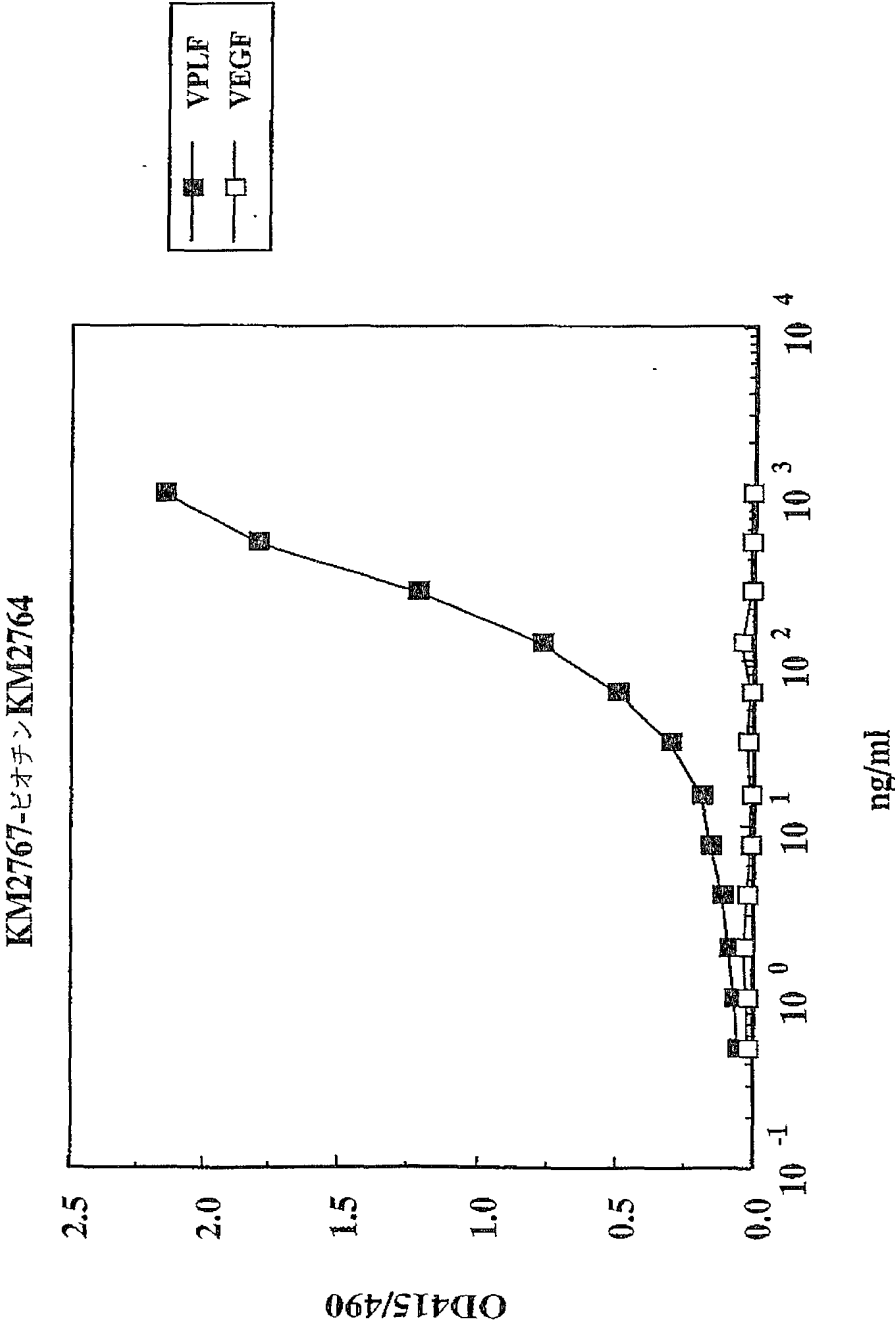


図 20



SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

HELIX RESEARCH INSTITUTE, INC.

<120> Antibody inhibiting VPLF activity

<130> PH-1425-PCT

<150> JP 2000-319985

<151> 2000-10-19

<160> 36

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 345

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Thr Ser Ala Leu Ala Gly Gln

1 5 10 15

Arg Gln Gly Thr Gln Ala Glu Ser Asn Leu Ser Ser Lys Phe Gln Phe

20 25 30

Ser Ser Asn Lys Glu Gln Asn Gly Val Gln Asp Pro Gln His Glu Arg

35

40

45

Ile Ile Thr Val Ser Thr Asn Gly Ser Ile His Ser Pro Arg Phe Pro

50

55

60

His Thr Tyr Pro Arg Asn Thr Val Leu Val Trp Arg Leu Val Ala Val

65

70

75

80

Glu Glu Asn Val Trp Ile Gln Leu Thr Phe Asp Glu Arg Phe Gly Leu

85

90

95

Glu Asp Pro Glu Asp Asp Ile Cys Lys Tyr Asp Phe Val Glu Val Glu

100

105

110

Glu Pro Ser Asp Gly Thr Ile Leu Gly Arg Trp Cys Gly Ser Gly Thr

115

120

125

Val Pro Gly Lys Gln Ile Ser Lys Gly Asn Gln Ile Arg Ile Arg Phe

130

135

140

Val Ser Asp Glu Tyr Phe Pro Ser Glu Pro Gly Phe Cys Ile His Tyr

145

150

155

160

Asn Ile Val Met Pro Gln Phe Thr Glu Ala Val Ser Pro Ser Val Leu

165

170

175

Pro Pro Ser Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Asn Asn Ala Ile Thr Ala

180

185

190

Phe Ser Thr Leu Glu Asp Leu Ile Arg Tyr Leu Glu Pro Glu Arg Trp
195 200 205

Gln Leu Asp Leu Glu Asp Leu Tyr Arg Pro Thr Trp Gln Leu Leu Gly
210 215 220

Lys Ala Phe Val Phe Gly Arg Lys Ser Arg Val Val Asp Leu Asn Leu
225 230 235 240

Leu Thr Glu Glu Val Arg Leu Tyr Ser Cys Thr Pro Arg Asn Phe Ser
245 250 255

Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu Lys Arg Thr Asp Thr Ile Phe Trp Pro
260 265 270

Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg Cys Gly Gly Asn Cys Ala Cys Cys Leu
275 280 285

His Asn Cys Asn Glu Cys Gln Cys Val Pro Ser Lys Val Thr Lys Lys
290 295 300

Tyr His Glu Val Leu Gln Leu Arg Pro Lys Thr Gly Val Arg Gly Leu
305 310 315 320

His Lys Ser Leu Thr Asp Val Ala Leu Glu His His Glu Glu Cys Asp
325 330 335

Cys Val Cys Arg Gly Ser Thr Gly Gly
340 345

<210> 2

<211> 1328

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (94).. (1128)

<400> 2

agtgcagcct tcccctggcg gtggtgaaag agactcggga gtcgctgctt ccaaagtgcc 60

cgccgtgagt gagctctcac cccagtcagc caa atg agc ctc ttc ggg ctt ctc 114

Met Ser Leu Phe Gly Leu Leu

1

5

ctg ctg aca tct gcc ctg gcc ggc cag aga cag ggg act cag gcg gaa 162

Leu Leu Thr Ser Ala Leu Ala Gly Gln Arg Gln Gly Thr Gln Ala Glu

10

15

20

tcc aac ctg agt agt aaa ttc cag ttt tcc agc aac aag gaa cag aac 210

Ser Asn Leu Ser Ser Lys Phe Gln Phe Ser Ser Asn Lys Glu Gln Asn

25

30

35

gga gta caa gat cct cag cat gag aga att att act gtg tct act aat 258

Gly Val Gln Asp Pro Gln His Glu Arg Ile Ile Thr Val Ser Thr Asn

40

45

50

55

gga agt att cac agc cca agg ttt cct cat act tat cca aga aat acg 306
 Gly Ser Ile His Ser Pro Arg Phe Pro His Thr Tyr Pro Arg Asn Thr
 60 65 70

gtc ttg gta tgg aga tta gta gca gta gag gaa aat gta tgg ata caa 354
 Val Leu Val Trp Arg Leu Val Ala Val Glu Glu Asn Val Trp Ile Gln
 75 80 85

ctt acg ttt gat gaa aga ttt ggg ctt gaa gac cca gaa gat gac ata 402
 Leu Thr Phe Asp Glu Arg Phe Gly Leu Glu Asp Pro Glu Asp Asp Ile
 90 95 100

tgc aag tat gat ttt gta gaa gtt gag gaa ccc agt gat gga act ata 450
 Cys Lys Tyr Asp Phe Val Glu Val Glu Glu Pro Ser Asp Gly Thr Ile
 105 110 115

tta ggg cgc tgg tgt ggt tct ggt act gta cca gga aaa cag att tct 498
 Leu Gly Arg Trp Cys Gly Ser Gly Thr Val Pro Gly Lys Gln Ile Ser
 120 125 130 135

aaa gga aat caa att agg ata aga ttt gta tct gat gaa tat ttt cct 546
 Lys Gly Asn Gln Ile Arg Ile Arg Phe Val Ser Asp Glu Tyr Phe Pro
 140 145 150

tct gaa cca ggg ttc tgc atc cac tac aac att gtc atg cca caa ttc 594
 Ser Glu Pro Gly Phe Cys Ile His Tyr Asn Ile Val Met Pro Gln Phe
 155 160 165

aca gaa gct gtg agt cct tca gtg cta ccc cct tca gct ttg cca ctg 642

Thr Glu Ala Val Ser Pro Ser Val Leu Pro Pro Ser Ala Leu Pro Leu
 170 175 180

gac ctg ctt aat aat gct ata act gcc ttt agt acc ttg gaa gac ctt 690
 Asp Leu Leu Asn Asn Ala Ile Thr Ala Phe Ser Thr Leu Glu Asp Leu
 185 190 195

att cga tat ctt gaa cca gag aga tgg cag ttg gac tta gaa gat cta 738
 Ile Arg Tyr Leu Glu Pro Glu Arg Trp Gln Leu Asp Leu Glu Asp Leu
 200 205 210 215

tat agg cca act tgg caa ctt ctt ggc aag gct ttt gtt ttt gga aga 786
 Tyr Arg Pro Thr Trp Gln Leu Leu Gly Lys Ala Phe Val Phe Gly Arg
 220 225 230

aaa tcc aga gtg gtg gat ctg aac ctt cta aca gag gag gta aga tta 834
 Lys Ser Arg Val Val Asp Leu Asn Leu Leu Thr Glu Glu Val Arg Leu
 235 240 245

tac agc tgc aca cct cgt aac ttc tca gtg tcc ata agg gaa gaa cta 882
 Tyr Ser Cys Thr Pro Arg Asn Phe Ser Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu
 250 255 260

aag aga acc gat acc att ttc tgg cca ggt tgt ctc ctg gtt aaa cgc 930
 Lys Arg Thr Asp Thr Ile Phe Trp Pro Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg
 265 270 275

tgt ggt ggg aac tgt gcc tgt tgt ctc cac aat tgc aat gaa tgt caa 978
 Cys Gly Gly Asn Cys Ala Cys Cys Leu His Asn Cys Asn Glu Cys Gln

| | | | | |
|---|------|-----|-----|--|
| 280 | 285 | 290 | 295 | |
| tgt gtc cca agc aaa gtt act aaa aaa tac cac gag gtc ctt cag ttg | 1026 | | | |
| Cys Val Pro Ser Lys Val Thr Lys Lys Tyr His Glu Val Leu Gln Leu | | | | |
| 300 | 305 | 310 | | |
| aga cca aag acc ggt gtc agg gga ttg cac aaa tca ctc acc gac gtg | 1074 | | | |
| Arg Pro Lys Thr Gly Val Arg Gly Leu His Lys Ser Leu Thr Asp Val | | | | |
| 315 | 320 | 325 | | |
| gcc ctg gag cac cat gag gag tgt gac tgt gtg tgc aga ggg agc aca | 1122 | | | |
| Ala Leu Glu His His Glu Glu Cys Asp Cys Val Cys Arg Gly Ser Thr | | | | |
| 330 | 335 | 340 | | |
| gga gga tagccgcac accaccagca gctcttgccc agagctgtgc agtgcagtgg | 1178 | | | |
| Gly Gly | | | | |
| 345 | | | | |
| ctgattctat tagagaacgt atgcgttata tccatcctta atctcagttg tttgcttcaa | 1238 | | | |
| ggacctttca tcttcaggat ttacagtgca ttctgaaaga ggagacatca aacagaatta | 1298 | | | |
| ggagttgtgc aacagctctt ttgagaagga | 1328 | | | |

<210> 3

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized oligo-cap linker sequence

<400> 3

agcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg

30

<210> 4

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized oligo (dT) primer sequence

<400> 4

gcggtgaag acggcctatg tggccttttt tttttttttt tt

42

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 5

agcatcgagt cggccttggt g

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 6

gcggctgaag acggcctatg t

21

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 7

tcttcgggct tctcctgctg acatctgccc

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 8

gcacacacag tcacactcct catggtgctc

30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 9

tgggtgcatt ggagcctcgc cttgctgctc

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 10

ctgtaggaag ctcatctctc ctatgtgctg

30

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 11

cagcacatag gagagatgag cttcctacag

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 12

ccgagcagtc agctggggga gatgtccctg

30

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 13

gccttcgagt ccggactcga cctctcggac

30

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 14

caggacatc tccccagct gactgctcgg

30

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 15

cagggctcca gtaatgaaca tggaccagtg

30

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 16

ggcaacttta acaggcacta attcaggtac

30

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 17

ttcccttgct tcctgcagct cctggccggg

30

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 18

agagaacgtc agctccacgt aggagggccg

30

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 19

ctcgcccatg ttctggccga ggaagccgag

30

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 20

ggccaccttg acgctgcggt ggtggacgcg

30

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 21

ctctgctgct acctgcgtct ggtcagcgcc

30

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 22

tctcacctgg acaggtcgca gctgcacctg

30

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 23

gatatcgccg cgctcgtcgt cgac

24

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 24

caggaaggaa ggctggaaga gtgc

24

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 25

accagagaga tggcagttgg acttaga

27

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 26

gagctgctgg tggaattctt actatcctcc

30

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

synthesized primer sequence

<400> 27

acttcttggc aaaatatattg tttttggaag

30

<210> 28

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<220>

<221> MOD RES

<222> (22)

<223> AMIDATION

<400> 28

Cys Thr Gln Ala Glu Ser Asn Leu Ser Ser Lys Phe Gln Phe Ser Ser

1

5

10

15

Asn Lys Glu Gln Asn Gly

20

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<220>

<221> MOD RES

<222> (17)

<223> AMIDATION

<400> 29

Cys Ser Ile Arg Glu Glu Leu Lys Arg Thr Asp Thr Ile Phe Trp Pro

1

5

10

15

Gly

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<220>

<221> MOD RES

<222> (1)

<223> ACETYLATION

<220>

<221> MOD RES

<222> (17)

<223> AMIDATION

<400> 30

Thr Phe Asp Glu Arg Phe Gly Leu Glu Asp Pro Glu Asp Asp Ile Cys

1

5

10

15

Lys

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 31

Cys Arg Gly Ser Thr Gly Gly

1

5

<210> 32

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 32

Asp Pro Ser Pro Phe Val Phe Gly Arg Lys Ser Arg Val Val Asp Leu

20,


```

1           5           10           15
Asn Leu Leu Thr Glu Glu Val Arg Leu Tyr Ser Cys Thr Pro Arg Asn
           20           25           30
Phe Ser Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu Lys Arg Thr Asp Thr Ile Phe
           35           40           45
Trp Pro Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg Cys Gly Gly Asn Cys Ala Cys
           50           55           60
Cys Leu His Asn Cys Asn Glu Cys Gln Cys Val Pro Ser Lys Val Thr
           65           70           75           80
Lys Lys Tyr His Glu Val Leu Gln Leu Arg Pro Lys Thr Gly Val Arg
           85           90           95
Gly Leu His Lys Ser Leu Thr Asp Val Ala Leu Glu His His Glu Glu
           100          105          110
Cys Asp Cys Val Cys Arg Gly Ser Thr Gly Gly
           115          120

```

<210> 33

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 33

Ser Pro Phe Val Phe Gly Arg Lys Ser Arg Val Val Asp Leu Asn Leu

1 5 10 15
Leu Thr Glu Glu Val Arg Leu Tyr Ser Cys Thr Pro Arg Asn Phe Ser

20

25

30

Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu Lys Arg Thr Asp Thr Ile Phe Trp Pro
 35 40 45
 Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg Cys Gly Gly Asn Cys Ala Cys Cys Leu
 50 55 60
 His Asn Cys Asn Glu Cys Gln Cys Val Pro Ser Lys Val Thr Lys Lys
 65 70 75 80
 Tyr His Glu Val Leu Gln Leu Arg Pro Lys Thr Gly Val Arg Gly Leu
 85 90 95
 His Lys Ser Leu Thr Asp Val Ala Leu Glu His His Glu Glu Cys Asp
 100 105 110
 Cys Val Cys Arg Gly Ser Thr Gly Gly
 115 120

<210> 34

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Description of Unknown Sequence: A partial sequence contained in
a commercially available plasmid pMbac (STRATAGENE)

<400> 34

Asp Pro Ser Pro

1

<210> 35

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:N-terminus sequence of
synthetic peptide of SEQ ID NO: 32

<400> 35

Asp Pro Ser Pro Phe Val

1

5

<210> 36

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:N-terminus sequence of
synthetic peptide of SEQ ID NO: 33

<400> 36

Ser Pro Phe Val Phe Gly

1

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09218

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/53, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C12P21/02, 21/08, C07K16/24,
A61K39/395, A61P9/10, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90, C07K16/00-16/46

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ

PIR/SWISSPROT/GENESEQ

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | WO 00/34474 A2 (Zymogenetics Inc.), 15 June, 2000 (15.06.00), & EP 1137773 A2 & AU 200021679 A | 1-33 |
| X | WO 00/18212 A2 (Ludwig Institute for Cancer Research), 06 April, 2000 (06.04.00), & EP 1123408 A1 & AU 9965029 A | 1-33 |
| X | WO 00/59940 A2 (Eli Lilly and Company), 12 October, 2000 (12.10.00) & AU 200040085 A | 1-33 |
| A | Kouhei MIYAZONO edition, Jikken Igaku Separate Volume BioScience Yougo Library, "Cytokine Zoushoku Inshi", 1 st edition, 30 May, 1995, pages 98 to 99 | 1-33 |
| PA | JP 2001-17188 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 23 January, 2001 (23.01.01), (Family: none) | 1-33 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 December, 2002 (11.12.02)

Date of mailing of the international search report
29 January, 2002 (29.01.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09218

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 34,35

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The above claims involve diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(I) of the PCT and Rule 39.1(IV) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/53, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C12P21/02, 21/08, C07K16/24, A61K39/395, A61P9/10, G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00-15/90, C07K16/00-16/46

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GENBANK/EMBL/DBJ/GENESEQ

PIR/SWISSPROT/GENESEQ

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA/REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X | WO 00/34474 A2 (ZYMOGENETICS INC) 2000. 06. 15 &EP 1137773 A2 &AU 200021679 A | 1-33 |
| X | WO 00/18212 A2 (LUDWIG INST CANCER RES) 2000. 04. 06 &EP 1123408 A1 &AU 9965029 A | 1-33 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 01. 02

国際調査報告の発送日

29.01.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X | WO 00/59940 A2 (LILLY & CO ELI) 2000. 10. 12 &AU 200040085 A | 1-33 |
| A | 宮園浩平等編, 実験医学別冊BioScience用語ライブラリー「サイトカイン・増殖因子」初版, 1995. 05. 30, p. 98-99 | 1-33 |
| PA | JP 2001-17188 A (協和醗酵工業株式会社) 2001. 01. 23 ファミリーなし | 1-33 |

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 34, 35 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、

上記請求の範囲は、人の治療方法を包含するものであるから、PCT17条(2)(a)(I)及びPCT規則39.1(IV)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。